

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS
VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS:
POTENCIAL BIOCONTROLE DA ANTRACNOSE EM
FRUTOS DE MAMÃO**

Laryssa Andrade da Luz Santos

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
AGOSTO – 2023**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS: POTENCIAL
BIOCONTROLE DA ANTRACNOSE EM FRUTOS DE
MAMÃO**

LARYSSA ANDRADE DA LUZ SANTOS

Bacharel em Engenharia Agrônômica, UFRB, 2016

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança
Coorientador: Prof. Dr. Harllen Sandro Alves Silva

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
AGOSTO – 2023**

Ficha Catalográfica

FICHA CATALOGRÁFICA

S237i

Santos, Laryssa Andrade da Luz.

Identificação e caracterização de compostos voláteis produzidos por bactérias endofíticas: potencial de biocontrole da antracnose em frutos de mamão / Laryssa Andrade da Luz Santos. – Cruz das Almas, BA, 2023.

90f.; il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Doutorado em Ciências Agrárias.

1.Mamão – Doenças e pragas – Antracnose. 2.Bactérias endofíticas – Controle biológico – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CRB 5 / 1615

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB. Responsável pela Elaboração Antonio Marcos Sarmento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E
BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS
PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS: POTENCIAL
BIOCONTROLE DA ANTRACNOSE EM FRUTOS DE MAMÃO**

Comissão Examinadora da Defesa de Tese de

Laryssa Andrade da Luz Santos

Aprovada em 02 de junho de 2023

Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Orientador

Prof^a. Dr^a Leilane Silveira Dávila - UFRB
Examinadora Interna

Profa. Dra. Leila Thaise Santana de Oliveira Santos – UNIFAN
Centro Universitário Nobre
Examinadora Externa

Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Barbosa
JCOBIOPRODUTOS
Examinador Externo

Prof. Dr. Valter Cruz Magalhães – UFLA
Universidade Federal de Lavras

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese a todos os meus ancestrais. Sankofa, é um termo originário de um símbolo visual da cultura africana que representa um pássaro com a cabeça voltada para trás e os pés para frente. Sankofa representa a importância do olhar para o passado para compreender o presente e poder construir um futuro melhor. Na cultura africana, esse conceito está fortemente associado à ideia de que a história e a ancestralidade são fundamentais para a construção da identidade e para a superação de desafios futuros. Eu não chegaria até aqui se não olhasse as minhas raízes, conhecesse a minha história e descobrisse o meu verdadeiro eu! Gratidão por tudo que fizeram, cada escolha, cada passo, para que hoje eu estivesse aqui.

"Monife lati ináàwọnoníşere"
"Eu dedico a vocês"

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer a mim, por não ter desistido. Eu me lembro de cada detalhe até chegar aqui e eu honro cada passo que eu dei. Foi uma jornada de inúmeros desafios, uma experiência e aprendizado sob a qual não consigo mensurar.

Uma gravidez no início do doutorado poderia ter impedido que eu continuasse, mas sim uma mulher por ser uma cientista, mãe, esposa, eu mesma, e quantas faces mais ela quiser. Uma pandemia também poderia ter atrapalhado, mas fortaleceu. Uma depressão profunda também poderia ter me parado, mas me fortaleceu, pois me deu a oportunidade de mergulhar em mim mesma e descobrir que eu estava aqui o tempo todo e não conseguia ver. Eu precisava me encontrar.

Deus, obrigada por não desistir de mim e ter me mostrado que eras tu de verdade! Ahh Deus maravilhoso. Nessa jornada acadêmica de quase 12 anos, eu preciso honrar a oportunidade de uma aluna de escola pública no Nordeste, chegar até aqui. Entraves, perseguições, nada disso pôde me parar. Já começo honrando e agradecendo o princípio, a UFRB, EMBRAPA, CAPES, sem a estrutura e incentivo, nada disso aqui seria possível.

Agradeço à Lucas meu esposo, por ter me mostrado que existia vida além do *Lattes*, que eu poderia ter uma família e por ter me presenteado com a nossa filha Maria Luíza. Gratidão meu amor, amo vocês; À minha mãe, à Mainha Milza “*in memoriam*”; à minha Dinda Iracema pela força, pelo incentivo e por acreditarem incondicionalmente em mim; à painho por ter me ensinado a ir sempre pela fé! Que honra em tê-los.

Agradeço aos meus orientadores Carlos e Harllen a quem chamo de “papai”, gratidão pela confiança, por não soltarem a minha mão, e por não me deixarem desistir. Vocês me mostraram que a ciência pode ser leve!

À Luciano e o laboratório de microbiologia do solo, onde eu aprendi a fazer a magia acontecer Gratidão Lu, por ter me conduzido, apoiado, direcionado nessa jornada. À Leandro, Fátima, ao laboratório de Fitopatologia por toda parceria e por me aturar com as análises intermináveis. À minha filhota Sarah, o que seria de mim sem você, sem seu apoio, sem sua amizade e parceria nessa jornada? Gratidão meu amor!

As minhas imparáveis Fanny e Becca, pelo apoio, amizade, cuidado, paciência e irmandade. Aproveitando o ensejo da irmandade, vou citar mais alguns parceiros de vida que me sustentaram a não desistir: Tâmara, Jadilson, Lucyana, Ana Paula, Valdirene, Aline Souza, Aline Rocha e Gisele. Vocês acreditaram mais em mim do que eu mesma, gratidão por tudo, eu amo vocês!

A Dra Anne Cristine, por ter surgido na minha vida, por ter sido caminho, e ter me conduzido do poço ao palácio. Enfim, aqui não se encerra um ciclo, inicia uma nova etapa da minha história.

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS: POTENCIAL BIOCONTROLE DA ANTRACNOSE EM FRUTOS DE MAMÃO

RESUMO GERAL

O mamão é uma fruta tropical valorizada mundialmente por suas propriedades nutritivas e seu sabor adocicado. Entretanto, a antracnose, causada por várias espécies de *Colletotrichum*, representa um grande desafio para a produção de mamão, resultando em perdas significativas na produção e na qualidade dos frutos. O controle químico com fungicidas sintéticos é amplamente utilizado, mas existem preocupações quanto à eficiência do controle, aos efeitos ambientais residuais e à saúde pública. Assim, o controle biológico com bactérias tem sido estudado como uma forma eficaz de reduzir as perdas econômicas na cultura. O objetivo deste trabalho foi selecionar bactérias endofíticas com potencial de biocontrole da antracnose em frutos de mamão causada por *Colletotrichum brevisporum* e caracterizá-las quanto à produção de biofilme e compostos voláteis *in vitro* e *in vivo* no Laboratório de Microbiologia de Solos da Embrapa Mandioca e Fruticultura. No primeiro capítulo, foram avaliadas 224 bactérias previamente testadas quanto à produção de compostos difusíveis, compostos voláteis, quitinase e inibição da germinação de conídios. Também foram observadas em relação ao crescimento a 37 °C, produção de biofilme e antibiose recíproca. Após esse screening inicial, foram selecionadas 12 bactérias. Dessas, quatro (768, 794, 898, 929) foram avaliadas em uso combinado, ao qual denominamos "Mix", quanto ao controle *in vivo* de *Colletotrichum brevisporum* em frutos de mamão e tempo de prateleira. Foram preparados três Mix bacterianos, e estes foram comparados ao fungicida em termos de eficácia, sendo observada diferença significativa no controle da doença. O Mix 1 foi utilizado para avaliar o melhor momento de aplicação nos frutos, ou seja, aplicação antes, concomitantemente ou após a presença do patógeno, e não foi observada diferença significativa. Além disso, verificou-se que, além de controlar o patógeno, o Mix 1 aumentou a vida útil dos frutos. Mesmo após 15 dias da aplicação das misturas bacterianas, os frutos permaneceram firmes e consistentes, diferindo da testemunha que amadureceu completamente em 10 dias. As bactérias foram identificadas como *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp. e *Chryseobacterium* spp. No segundo capítulo, caracterizou-se o perfil dos compostos voláteis produzidos pelas espécies identificadas no experimento anterior na ausência e na presença do patógeno. Também se avaliou como esses compostos atuaram no controle da antracnose, uma vez que a produção de compostos voláteis foi observada em todas as bactérias testadas. Em conclusão, este estudo identificou bactérias endofíticas produtoras de biofilme com potencial para o controle biológico da antracnose em frutos de mamão. O Mix bacteriano testado apresentou eficácia comparável à dos fungicidas sintéticos, além de aumentar a vida útil dos frutos. A caracterização dos compostos voláteis produzidos pelas bactérias identificadas e a análise filogenética multilocus contribuíram para o entendimento dos mecanismos de ação das bactérias no controle da antracnose. Este estudo fornece informações importantes para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis e seguras para o controle da antracnose em frutos de mamão.

Palavras-chave: Controle biológico; Compostos antimicrobianos, Papaya, Quorum sensing.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF VOLATILE COMPOUNDS PRODUCED BY ENDOPHYTIC BACTERIA: POTENTIAL BIOCONTROL OF ANTHRACNOSE IN PAPAYA FRUITS

GENERAL ABSTRACT

Papaya is a tropical fruit highly valued worldwide for its nutritional properties and sweet flavor. However, anthracnose, caused by several species of *Colletotrichum*, represents a major challenge for papaya production, resulting in significant losses in yield and fruit quality. Chemical control using synthetic fungicides is widely employed, but concerns arise regarding control efficiency, residual environmental effects, and public health. Therefore, biological control using bacteria has been studied as an effective means to reduce economic losses in the crop. The objective of this study was to select endophytic bacteria with biocontrol potential against anthracnose in papaya fruits caused by *Colletotrichum brevisporum* and to characterize them regarding biofilm and volatile compound production in vitro and in vivo at the Embrapa Cassava and Fruits Soil Microbiology Laboratory. In the first chapter, 224 bacteria were evaluated, previously screened for the production of diffusible compounds, volatile compounds, chitinase, and conidial germination inhibition. Additionally, their growth at 37°C, biofilm production, and reciprocal antibiosis were observed. After this initial screening, 12 bacteria were selected. Among these, four (768, 794, 898, 929) were evaluated in combined use, referred to as "Mix," for in vivo control of *Colletotrichum brevisporum* in papaya fruits and shelf life. Three bacterial Mixtures were prepared and compared to the fungicide in terms of efficacy, with a significant difference observed in disease control. Mix 1 was used to assess the best application timing on the fruits, i.e., application before, concomitant with, or after pathogen presence, and no significant difference was observed. Furthermore, it was found that, besides controlling the pathogen, Mix 1 extended the shelf life of the fruits. Even 15 days after the application of bacterial mixtures, the fruits remained firm and consistent, differing from the control, which fully ripened in 10 days. The bacteria were identified as *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp. and *Chryseobacterium* spp. In the second chapter, the profile of volatile compounds produced by the identified species in the previous experiment was characterized in the absence and presence of the pathogen. The effectiveness of these compounds in anthracnose control was also evaluated since the production of volatile compounds was observed in all tested bacteria. In conclusion, this study identified endophytic bacteria capable of biofilm production with potential for biological control of anthracnose in papaya fruits. The tested bacterial Mix showed comparable efficacy to synthetic fungicides, besides extending the shelf life of the fruits. The characterization of volatile compounds produced by the identified bacteria and the multilocus phylogenetic analysis contributed to understanding the mechanisms of action of bacteria in anthracnose control. This study provides valuable information for the development of sustainable and safe strategies for anthracnose control in papaya fruits.

Keywords: Biological control; Antimicrobial compounds, Papaya, Quorumsensing.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mecanismos de ação de bactérias endofíticas formadoras de biofilme no biocontrole da antracnose causado por *Colletotrichum brevisporum*..... 42

Tabela 2: Composição dos “Mix” bacterianos aplicados em frutos de mamão.....46

Tabela 3: Identificação taxonômica dos isolados de acordo com as consultas realizadas utilizando alinhamentos de sequências em bancos de dados referência para gene 16S rRNA, GenBank (BLASTn).....49

Tabela 4: Mecanismos de ação de bactérias endofíticas formadoras de biofilme no biocontrole da antracnose causado por *Colletotrichum brevisporum*.....70

Tabela 5: Compostos voláteis produzidos pelas bactérias endofíticas antagonistas a *Colletotrichum brevisporum* na ausência/presença do fungo identificados pelo método HS-SPME por GC-MS, após 10 dias de cultivo em meio NA.....81

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo da antracnose do mamoeiro causada por *Colletotrichum* spp.....20
- Figura 2:** Disposição dos mecanismos de ação presentes em antagonistas bacterianos endofíticos de mamoeiro. CV; compostos voláteis, CD; compostos difusíveis, Q; quitinase, IC; Inibição da germinação de conídios).....50
- Figura 3:** Avaliação da compatibilidade entre os antagonistas endofíticos de mamoeiro por meio da de antibiose recíproca. A ausência de halos ao redor das colônias indica compatibilidade entre os isolados..... 50
- Figura 4:** Avaliação da formação de biofilme bacteriano por isolados endofíticos antagonistas a *C. brevisporum* em placa de ELISA, por meio da leitura de absorbância a 600 nm, durante o período de 24/48/72 horas em meio mínimo de sais.....51
- Figura 5:** - Porcentagem de redução da área lesionada por *C. brevisporum* em frutos de mamão52
- Figura 6:** Variação de classes químicas dos compostos voláteis produzidos pelas bactérias endofíticas antagonistas a *Colletotrichum brevisporum* na ausência/presença do fungo identificados pelo método HS-SPME por GC-MS, após 10 dias de cultivo em meio NA.75
- Figura 7:** Quantidade de compostos voláteis produzidos pelas bactérias endofíticas antagonistas a *Colletotrichum brevisporum* na ausência/presença do fungo identificados pelo método HS-SPME por GC-MS, após 10 dias de cultivo em meio NA.....76
- Figura 8:**Diagrama de Venn com o total de compostos orgânicos voláteis produzidos pelas bactérias endofíticas avaliadas na ausência do fungo identificados pelo método HS-SPME por GC-MS, após 10 dias de cultivo em meio NA.....77
- Figura 9:** Diagrama de Venn com o total de orgânicos voláteis produzidos pelas bactérias endofíticas avaliadas na presença do fungo identificados pelo método HS-SPME por GC-MS, após 10 dias de cultivo em meio NA.....78

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2.0 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.2 Controle químico.....	20
2.4 Compostos orgânicos voláteis (COVs).....	23
2.5 Biofilme bacteriano	26
CAPÍTULO 1.....	38
BIOPROTEÇÃO DE FRUTOS DE MAMÃO À ANTRACNOSE COM USO COMBINADO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS.....	38
RESUMO GERAL.....	39
1.0 INTRODUÇÃO	41
2.0 MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 Seleção dos isolados.....	42
2.2 Extração e análise de gDNA PCR Sequenciamento de <i>amplicon</i>	43
2.3 Antibiose recíproca.....	44
2.4 Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade de formação de biofilme.....	44
2.5 Avaliação da redução da antracnose frutos inteiros	45
2.6 Avaliação do melhor tempo de aplicação dos Mix bacterianos em frutos inteiros	47
2.7 Análise do tempo de prateleira	47
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1 Seleção dos isolados.....	48
3.2 Antibiose por difusão em dupla camada.....	49
3.4 Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade de formação de biofilme das bactérias endofíticas	50
3.5 Avaliação da redução da antracnose em frutos inteiros	51
3.5 Avaliação do tempo de aplicação dos Mix bacterianos em frutos inteiros	53
3.6 Análise do tempo de prateleira	53
REFERÊNCIAS.....	62
CAPÍTULO 2.....	66
IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS ORGÂNICOS EM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS FORMADORAS DE BIOFILME.....	66
IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS ORGÂNICOS EM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS FORMADORAS DE BIOFILME.....	67
1.0 INTRODUÇÃO	69

2.0 MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1 Seleção das bactérias	70
2.2 Produção de compostos antimicrobianos voláteis.....	71
2.3 Análise por HS-SPME por GC-MS para determinação de compostos orgânicos voláteis em amostras de isolados bacterianos.	72
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
REFERÊNCIAS.....	87

1.0 INTRODUÇÃO GERAL

O mamão é uma fruta tropical conhecida por seu sabor adocicado e suas propriedades nutritivas. Amplamente consumido em todo o mundo, o mamão é especialmente popular no Brasil, onde ocupa o terceiro lugar no ranking das frutas mais consumidas, atrás apenas da banana e da laranja. De acordo com a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Papaia (BRAPEX), o Brasil é o segundo maior consumidor de mamão do mundo, ficando atrás somente da Índia. Com sua crescente popularidade e importância econômica, o mamão se tornou uma das frutas mais valorizadas no mercado global (Embrapa,2023).

Embora a cultura do mamoeiro seja de grande importância, as doenças que afetam seus frutos representam um grande obstáculo para a expansão da produção. Em especial, a antracnose, pois compromete consideravelmente a qualidade dos frutos e leva a perdas na produção (Vilaplana,2020).

Várias espécies de *Colletotrichum* pertencentes aos complexos "*acutatum*" e "*gloeosporioides*" têm sido relatadas como agentes causadores da doença. No Brasil, as espécies *C. brevisporum*, *C. truncatum* e *C. okinawense* têm sido identificadas como causadoras de antracnose em mamoeiros, conforme relatado por (Vieira *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2017; Dias *et al.*, 2020).

Em 2022, o mamão foi a sexta fruta mais exportada do Brasil. Foram comercializadas 39,8 mil toneladas, com faturamento de quase US\$ 50 milhões. Além disso, o mamão é uma das frutas mais exportadas pelo Brasil. Em 2020, o país exportou mais de 85 mil toneladas de mamão, principalmente para os países europeus. No entanto, estima-se que as perdas na produção de mamão no país devido a doenças cheguem a 50% (CEPEA,2023). A antracnose é uma das principais causas da redução na qualidade dos frutos. Destaca-se que o *Colletotrichum* spp. recentemente registrados, associado à antracnose em frutas, pode infectar múltiplos hospedeiros, no entanto, algumas espécies podem ser específicas do hospedeiro. Por meio do uso de diversos marcadores, várias espécies filogenéticas de *Colletotrichum* foram identificadas como agente causal da antracnose (Zakaria,2021).

A infecção por espécies de *Colletotrichum* spp podem infectar várias partes

planta, em diferentes estágios de desenvolvimento, no entanto, a infecção durante as fases de pós-colheita ou maturação é responsável por grandes perdas econômicas. Devido à formação de lesões deprimidas, com bordos irregulares e de coloração de marrom escuro a preto na superfície do fruto, a antracnose reduz a qualidade e a comercialização do fruto. Para minimizar a incidência da doença, os exportadores frequentemente utilizam fungicidas sintéticos, a fim de prolongar a vida pós-colheita dos frutos (Vilaplana *et al.*,2020; Zakaria,2021).

Todavia, em virtude da pressão exercida pelo mercado importador, além exigências e barreiras fitossanitárias rígidas, aumenta a demanda por outros métodos mais seguros e promissores para o controle de doenças. promover a segurança alimentar, ambiental e consequentemente maximizar a cadeia de exportação do fruto (Efsa,2023).

Em busca de outros métodos ao controle químico, surge o controle biológico com os estudos foram direcionados para o uso de microrganismos endofíticos, especialmente bactérias produtoras de biofilme. O controle biológico (CB) é uma importante estratégia de manejo para doenças fúngicas. Baseia-se na utilização de microrganismos vivos como bactérias endofíticas para reduzir e/ou manter a população de um fitopatógeno abaixo dos níveis que causam perdas econômicas, além de ínfimos efeitos residuais ao ambiente e aos consumidores (Cuthbert *et al.*,2018).

Estas bactérias colonizam o interior das plantas sem causar doenças e são capazes de produzir compostos que promovem promoção do crescimento vegetal, e ainda na proteção contra fitopatógenos (Santos *et al.*,2021).

A capacidade de atuação de um agente de controle de doenças deve-se a uma variedade de mecanismos de ação Lanna Filho *et al.* (2010), dentre esses a competição por nutrientes e espaço. Wang *et al.* (2021); a indução de resistência Araujo e Meneses. (2009); Chalfoun *et al.* (2011), a antibiose. Louzada *et al.* (2009), ocorrência de parasitismo Klein *et al.* (2013), produção de compostos antimicrobianos difusíveis e voláteis ASARI *et al.*, (2016), produção de quitinases (Spadaro, Droby,2016), além da associação de biofilme (BAIS *et al.*,2009).

As bactérias são excepcionais na produção de várias substâncias compostos orgânicos voláteis (COVs). São substâncias produzidas por microrganismos que permitem a comunicação com outros organismos, sejam eles da mesma espécie

ou de espécies diferentes. Essa comunicação ocorre por meio de vias de sinalização inter e intracelular, sendo que os COVs podem ser liberados para o ambiente externo ou permanecer dentro das células produtoras (Schalchli *et al.*,2016).

Esses compostos são capazes de desencadear respostas fisiológicas e comportamentais em outros organismos, e podem ter papel importante na adaptação e sobrevivência dos microrganismos em diferentes ambientes. Ademais os COVs são moléculas chave para o entendimento da do biocontrole bacteriano (Chandrasekaran; Paramasivan; Sahayarayan,2022).

O biofilme, por sua vez, é um fenômeno natural no qual as bactérias crescem em associação com outras bactérias e/ou superfícies e interfaces. Trata-se de comunidades de células estruturadas que se aderem a superfícies bióticas ou abióticas e formam uma matriz polimérica extracelular (Watnick; Kolter,1998), por meio do quórum sensing, e tem sido estudado em virtude do seu efeito no biocontrole quando associado aos mecanismos de ação dos agentes bacterianos (Rafique *et al.*,2015).

Embora os mecanismos de ação expressados dos agentes de biocontrole sejam distintos, é possível que um mesmo microrganismo apresente mais de um recurso, o que aumenta a eficácia no controle de doenças. É desejável que os antagonistas selecionados possuíssem mais de uma estratégia de ação, para vislumbrar maiores chances de sucesso no controle (Bettiol; Ghini,1995).

A utilização de bactérias como agentes de biocontrole com esta capacidade de adesão tem se mostrado um método promissor. São capazes de colonizar as superfícies dos frutos, competir com o patógeno e produzir substâncias que inibem o crescimento do agente causal da antracnose em frutos de mamão, resultando em controle com mesma eficiência do que fungicida (Santos *et al.*, 2021).

Vários microrganismos antagonistas têm sido recomendados para uso em campos antes da colheita com a finalidade de proteger o cultivo pós-colheita (Beneduzi, Ambrosini, Passaglia,2012; Bahadou *et al.*,2023). Yu, Lee (2015) demonstraram que a bactéria *Pseudomonas putida* inibiu a germinação de esporos de *Penicillium digitatum* devido à disponibilidade de nutrientes do hospedeiro. Outras bactérias inibiram diferentes fungos fitopatogênicos, como *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans* no Controle biológico (CB)

de patógenos pós-colheita em frutos de maçã (Kim, Balaraju, Jeon, 2016). *Pseudomonas fluorescens* em tangerina (Thokchom *et al.*,2017) e *Bacillus megaterium* na podridão anelar da macieira (Chen *et al.*,2016).

Lopes *et al.* (2015) avaliaram a eficácia de diferentes microrganismos antagonistas no controle de *Colletotrichum acutatum* em frutas cítricas e encontraram resultados promissores. Silva, De Costa (2014) avaliaram o potencial de *Burkholderia spinosa* em banana (*Musa* spp.). Camañas *et al.* (2008) avaliaram a eficiência de diferentes formulações da bactéria antagonista *Pantoea agglomerans* com para controle de doenças pós-colheita em frutas cítricas contra *Penicillium digitatum* na pós-colheita.

Produtos comerciais à base de microrganismos, como *Bacillus* spp, têm sido registrados no Brasil para o controle da antracnose causada por *Colletotrichum* spp. em diversas culturas. As bactérias apresentam diversos mecanismos antagônicos em relação aos fungos fitopatógenos, notadamente competição por espaço e nutrientes, enzimas hidrolíticas, indução de resistência, síntese de compostos voláteis e biofilmes (Safdarpour, Khodakaramian,2018; Dukare,2019).

O uso de bactérias como agentes de biocontrole tem sido muito importante no manejo integrado de cultivos, onde se destaca seu valor como controle pós-colheita de doenças fúngicas.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do mamão

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma planta herbácea perene pertencente à família Caricaceae e originária da América tropical (Manica, 2006). Por ser adaptada ao clima dessa região, apresenta uma grande diversidade genética, talvez devido ao seu centro de origem estar localizado na Bacia Amazônica Superior, mais especificamente na região noroeste da América do Sul, conforme apontado por (Salomão, 2007).

A cultura é amplamente difundida no Brasil, onde são cultivadas diversas variedades, como a Formosa, a Tainung, a Papaia e a Havaí. A variedade mais consumida pelo mercado interno pertence ao grupo Formosa, enquanto a Havaí

é a mais exportada. A importância econômica do cultivo do mamão é significativa, tanto para o Brasil quanto para o mundo, uma vez que é uma fruta muito demandada em diversos mercados internacionais (Cepea, 2023).

De acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o Brasil exportou mais de 85 mil toneladas de mamão em 2020, com faturamento de quase US\$ 100 milhões. Além disso, a produção de mamão é importante para a geração de empregos e para a diversificação da agricultura brasileira. Em um contexto global, o mamão é uma das frutas mais consumidas no mundo, com destaque para a demanda crescente em países como China e Índia (Incaper, 2023).

O Brasil é o segundo maior produtor da fruta no mundo, ficando atrás apenas da Índia (Fao, 2021). O mamoeiro é cultivado em praticamente todo território nacional, entretanto, a Bahia é o estado que lidera, sendo responsável por cerca de 40% da produção total no país. Em seguida, vem o Espírito Santo, com aproximadamente 30% da produção, e Minas Gerais, com cerca de 10%. Os demais estados são responsáveis por 20% (Incaper, 2023).

Em relação à receita gerada, em dados específicos disponíveis para o mamão, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o valor bruto da produção (VBP) da fruta em 2020 foi de R\$ 34,3 bilhões.

O Brasil é atualmente o maior exportador de mamão do mundo. Aproximadamente 16,5% da produção nacional foi destinada à exportação. A discrepância entre a produtividade e a exportação é decorrente de problemas fitossanitários, condições climáticas desfavoráveis, inadequadas durante a colheita e pós-colheita, entre outros fatores (Mapa, 2023).

A União Europeia (UE) é um mercado importante para as frutas tropicais exportadas pelo Brasil, principalmente o mamão. No entanto, as barreiras fitossanitárias impostas pela UE são rígidas, especialmente em relação ao uso de agrotóxicos. O bloco europeu possui um sistema rigoroso de controle de resíduos de agrotóxicos em produtos importados, o que pode representar um desafio para os produtores brasileiros. Apesar disso, a demanda por frutas tropicais no mercado europeu tem aumentado nos últimos anos, e a diversificação de mercados continua sendo uma estratégia importante para os produtores brasileiros (Efsa, 2023).

Entre as doenças que acometem o mamão, a antracnose é uma das mais

preocupantes e pode causar perdas significativas na produção e na qualidade dos frutos. Estima-se que as perdas na agricultura brasileira causadas por doenças de plantas mudaram de 10% a 30% da produção total, comprometendo a qualidade final do produto e conseqüentemente a comercialização (Marques *et al.*, 2019).

2.1 A antracnose no mamoeiro

A antracnose é um dos problemas fitossanitários responsáveis por perdas expressivas na produção de mamão. É uma doença fúngica pós-colheita geralmente associada ao *Colletotrichum gloesporioides*, teleomorfo *Glomerella cingulata* (Dantas, 2003). Segundo Oliveira *et al.* (2000), a antracnose é uma doença que ocorre frequentemente em regiões produtoras de frutas em todo o mundo, e seus sintomas se manifestam em frutos maduros durante as fases de embalagem, transporte, amadurecimento e comercialização. Esse problema é considerado um dos fatores que limitam a produtividade e a exportação desses frutos (Vilaplana, 2020).

Embora a antracnose seja de suma importância na fase pós-colheita, a infecção inicia-se geralmente no campo, ocorrendo normalmente após a floração, favorecida pelas condições climáticas das regiões produtoras, resultante da entrada do patógeno direta ou indiretamente por fissuras naturais e/ou por injúrias mecânicas provocadas durante a colheita, transporte e armazenamento (Fischer *et al.*, 2017).

A antracnose produz lesões deprimidas, com coloração escurecida com bordas marrom-claro irregulares nos frutos de mamão. Após a infecção, muitos patógenos da antracnose adotam quiescência ou latência, o que é comum em patógenos que causam doenças pós-colheita, incluindo *Colletotrichum spp.* Durante o período de latência, os patógenos da antracnose permanecem dormentes nos tecidos do hospedeiro até que as condições ambientais e a fisiologia do hospedeiro sejam propícias para sua reativação e posterior desenvolvimento. Geralmente na pós-colheita, durante o período de armazenamento e vida útil dos frutos (De Andrade; Vieira, 2016; Kuhlcamp *et al.*, 2022).

Os patógenos da antracnose infectam não apenas frutas, mas também

outros órgãos da planta, incluindo folhas, flores, galhos e galhos. Os conídios e esporos formados nesses tecidos infectados são posteriormente liberados e dispersos em dias chuvosos por meio de respingos de água ou em períodos de alta umidade, tornando-se o inóculo primário para a infecção dos frutos na fase pré-colheita (Fitzel, Peak, 1984).

Os conídios do fungo aderem à superfície das plantas onde germinam e desenvolvem um tubo germinativo e, na sua extremidade, é formado um apressório. Essas estruturas aderem à cutícula da planta hospedeira e produzem enzimas que são importantes para sinalizar, aderir e enfraquecer a parede celular da planta. Esse processo ocorre porque o apressório se torna melanizado e secreta enzimas hidrolíticas, incluindo pectinases (Perfect *et al.*, 1999).

A antracnose possui como característica marcante a ocorrência de lesões necróticas grandes e arredondadas nos frutos, com bordas suspensas e uma leve depressão no centro das lesões, onde é possível observar massas de esporos de cor róseo-alaranjado. No interior do tecido afetado, apresenta-se firme e com coloração branca-acinzentada, tornando-se marrom posteriormente. Pequenas lesões individuais podem se fundir para produzir lesões maiores, que se espalham por toda a superfície do fruto, podendo penetrar na polpa e causar a podridão-mole, tornando o fruto inviável para consumo humano (Embrapa, 2009; Moura *et al.*, 2013; Cordeiro *et al.*, 2016).

As espécies de *Colletotrichum* spp. podem ser diferenciadas e classificadas em complexos e grupos de espécies. São diferenciadas com base em várias características, incluindo morfologia, biologia molecular e sequências genéticas. A morfologia inclui características macroscópicas, como cor, textura e tamanho das colônias, e características microscópicas, como tamanho, forma e número de conídios e apressórios. A biologia molecular envolve a análise do DNA, incluindo sequenciamento de genes específicos, como o ITS (espaçador transcrito interno) e o gene da β -tubulina, bem como a análise de marcadores de DNA como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Talhinhas; Baroncelli, 2021).

O ciclo da antracnose é iniciado no processo de disseminação, a forma ativa da doença se dá na germinação dos esporos e na penetração das hifas no tecido do hospedeiro, por meio de injúrias mecânicas, físicas, fatores extrínsecos

ou pelo manejo. Os principais agentes são os respingos de água da chuva e insetos, que promovem a dispersão dos conídios presentes no micélio dos tecidos doentes para as novas brotações (Blood *et al.*, 2020). (Figura 1).

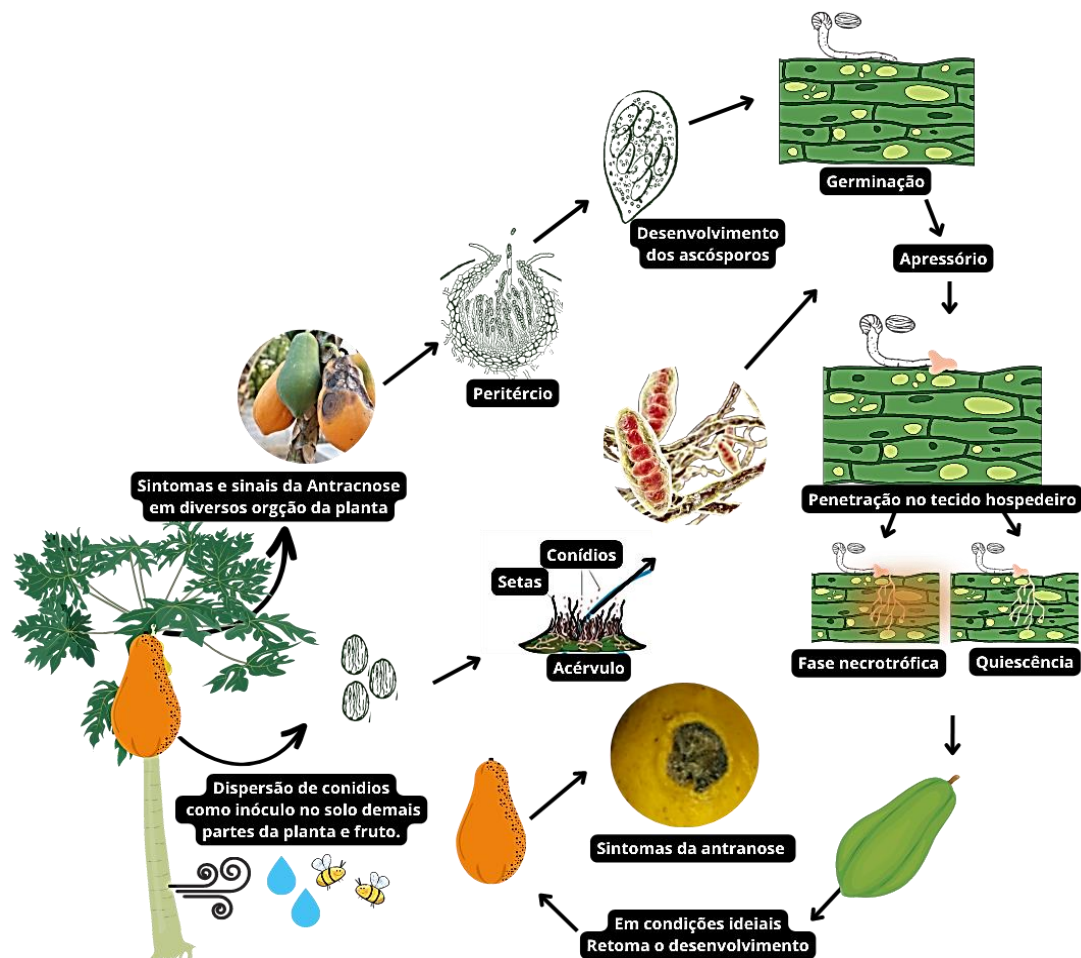


Figura 1. Ciclo da antracose do mamoeiro causada por *Colletotrichum* spp. (Ilustração: Laryssa Andrade).

2.2 Controle químico

O controle da antracose no mamão em pré-colheita é realizado frequentemente por meio da aplicação de fungicidas, pela eficácia, baixo custo e facilidade de aplicabilidade. No entanto, o uso dessas substâncias representa um sério risco para a saúde humana e para o meio ambiente, tanto pelo efeito residual no ser humano quanto pelos efeitos poluentes no solo e na água (Valenzuela *et al.*, 2015).

No Brasil, existem diversos produtos comerciais à base de fungicidas sintéticos liberados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para o controle da antracnose no mamoeiro, como o clorotalonil, o difenoconazol, o azoxistrobina e o tebuconazol (Agrofit, 2023).

O uso de um fungicida é um componente crítico no MIP (Manejo Integrado de Pragas) para prevenção e controle de doenças. No entanto, seu uso indevido, bem como tratamentos consecutivos à base de substâncias com os mesmos mecanismos de ação, tem sido relacionado à diminuição da sensibilidade de patógenos e ao surgimento de cepas resistentes. Além disso, a aplicação rotativa de diferentes classes de fungicidas pode resultar em resistência múltipla a fungicidas (Chechi *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2015).

Entre as espécies de *Colletotrichum* relatadas com mutações que costumam conferir resistência à classe de fungicidas metil-benzimidazol-carbamato (MBC), que são uma classe de fungicidas sistêmicos de amplo espectro utilizados no controle de doenças fúngicas como a antracnose, incluem *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. truncatum*, *C. cereale*, *C. fructicola*, *C. acutatum* e *C. musae* (Cortaga *et al.*, 2023).

Para o controle da antracnose em cultivo de mamão no Brasil, alguns dos fungicidas mais utilizados incluem: azoxistrobina + ciproconazol, clorotalonil, piraclostrobina + metominostrobin, triazóis (como o difenoconazol, propiconazol e tebuconazol). Para o tratamento pós-colheita, a maioria dos fungicidas utilizados para o controle da antracnose em mamão é à base de tiabendazol. O tiabendazol é um fungicida que possui ação sistêmica e atua na prevenção e controle de várias doenças fúngicas, incluindo a antracnose. No entanto, o uso de tiabendazol em pós-colheita tem sido objeto de discussões devido a preocupações sobre a segurança alimentar e a possibilidade de resíduos nos frutos (Mapa, 2023; Agrofit, 2023).

A utilização de fungicidas na pós-colheita do mamão é condicionada pelo destino dos frutos, com base em requisitos de qualidade impostos pelos mercados interno e externo. No caso do consumo nacional, a aplicação de fungicidas sintéticos é comum, muitas vezes realizada sem critérios técnicos, com o objetivo de minimizar problemas fitossanitários. Já para a exportação, há uma necessidade de cumprir padrões de qualidade alcançados pelos compradores, experimentando a certificação dos frutos (Santos *et al.*, 2021).

Recentemente, vários governos introduziram regulamentos sobre o uso de produtos fitossanitários no setor agroalimentar e a presença de resíduos químicos em produtos (resíduos de nível máximo, MLR), como a diretiva europeia 2009/128/CE, deliberada com o objetivo de mitigar os efeitos adversos das práticas agrícolas e promover a implementação de abordagens mais seguras na União Europeia. Como consequência, alguns fungicidas usados para neutralizar *Colletotrichum* spp. foram banidos (Lokare, Fatima; Jogdale, 2021).

Da mesma forma, o procloraz, eficaz na prevenção da fitopatologia em manga e abacate (Diskin *et al.*, 2019; Shimshoni *et al.*, 2020), foi recentemente listado como um poluente prioritário pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) devido a seus supostos efeitos carcinogênicos.

As exportações de mamão brasileiro apresentaram uma queda em relação ao recorde alcançado em 2021. Segundo dados da Secex, em 2022, foram exportadas 36,8 mil toneladas, o que representa uma redução de 20% em comparação com o mesmo período do ano anterior. A redução é atribuída principalmente à baixa oferta nacional, devido às perdas por doenças, e ao uso de fungicidas que não são permitidos pelo mercado exportador (Cepea, 2023).

O mecanismo de ação dos ativos utilizados para o controle da antracnose no mamoeiro pode variar dependendo do grupo químico. Alguns ativos podem atuar por contato, como o clorotalonil que atua como um protetor, formando uma barreira na superfície da planta e impedindo a penetração do fungo nas células hospedeiras, além de inibir a germinação dos esporos e o crescimento do micélio do fungo (Batista *et al.*, 2017).

Já o difenoconazol e o tebuconazol são fungicidas do grupo dos triazóis, atuam inibindo a biossíntese do ergosterol, um componente essencial da membrana celular dos fungos, levando à sua morte por fim. A azoxistrobina atua na inibição da respiração no complexo III, citocromo bc1, interferindo na síntese de ATP (Batista *et al.*, 2017).

Diante desse cenário, é fundamental desenvolver pesquisas que visem à redução e/ou substituição desses produtos tóxicos, como é o caso da produção integrada que utiliza outros métodos para o controle de doenças. Uma das estratégias utilizadas no manejo de frutos é a combinação de fungicidas em concentrações mais baixas, juntamente com outros métodos. Essa abordagem

pode reduzir a exposição a produtos químicos.

A União Europeia é o principal mercado importador de mamão do Brasil e possui regras rígidas quanto ao uso de agrotóxicos (EFSA, 2023). Por isso, é importante que os produtores brasileiros se adequem às exigências do mercado europeu. Além disso, existem outras formas de controle da antracnose no mamoeiro, como a utilização de fungicidas biológicos à base de *Bacillus* spp.

2.4 Compostos orgânicos voláteis (COVs)

Os Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) são substâncias produzidas por microrganismos, especialmente por bactérias. Essa classe de compostos permite que o microrganismo se comunique com outros por vias de sinalização inter e intracelular. Os COVs possuem eficácia potencial para utilização não apenas em condições de campo, mas também em pós-colheita e armazenamento (Chandrasekaran; Paramasivan; Sahayarayan, 2022).

Os COVs não apenas controlam os fitopatógenos, mas também aumentam a taxa de sobrevivência dos microrganismos, removendo potenciais competidores por nutrientes, como os fitopatógenos. Guerrero et al. (2011) mostraram a natureza antifúngica de COVs produzidos por 12 isolados de espécies de *Pseudomonas* e seu potencial uso no biocontrole de fungos fitopatogênicos, como o *Sclerotinia sclerotiorum*. Da mesma forma, os COVs de duas cepas de *Bacillus* sp. endofíticos reduziram significativamente o peso e o número de escleródios de *S. sclerotiorum* a longo prazo (Spadaro; Droby, 2016).

Seidl et al. (2008) confirmaram que isolados rizobacterianos de *P. fluorescens*, *P. trivialis*, *Serratia plymuthica*, *S. odorifera*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *S. rhizophila* produziram um grupo de COVs e inibiram o crescimento de *Rhizoctonia solani*. Da mesma forma, *B. subtilis* produziu COVs como benzaldeído, nonanal, benzotiazol e acetofenona, que atuaram contra o agente causador da podridão anelar da batata, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, reduzindo o tamanho de suas colônias e causando outras anormalidades nas células (Rajer et al., 2017).

Além disso, em uma mistura de 30 COVs, o tridecano mostrou-se eficaz contra *P. syringae* pv. *maculicola* estirpe ES4326 via mecanismo de indução de Resposta Sistêmica Induzida (ISR) (Kobayashi, Iwano, 2012). A resistência

sistêmica induzida (ISR) é um importante mecanismo de defesa ativado quando a planta entra em contato com determinadas substâncias, como o tridecano, que estimulam a ativação de mecanismos de defesa, tornando-a mais resistente a esse patógeno específico.

Já a acetoína, produzida por *B. subtilis*, também desempenhou papel significativo ao induzir resistência sistêmica em *Arabidopsis thaliana* contra *P. syringae*, por meio da ativação da via de sinalização ácido salicílico (SA) (Kaufmann et al., 2017). A resistência sistêmica adquirida, nesse caso, foi observada após o contato direto da planta com o patógeno, desencadeando uma resposta de defesa mais ampla e duradoura contra o patógeno.

Adicionalmente, em plantas de milho, os mesmos COVs de *Enterobacter aerogenes* induziram resistência contra o fungo *Setosphaeria turcica* (Haggag, Timmusk, 2008). Novamente, mecanismos de defesa específicos da planta foram ativados por meio da ISR contra o agente patogênico, proporcionando proteção contra futuras infestações.

Assim sendo, tanto a resistência sistêmica adquirida quanto a resistência sistêmica induzida desempenham papéis cruciais na defesa das plantas contra patógenos específicos. A resistência adquirida ocorre após o contato direto com o patógeno, conferindo proteção de longo prazo, enquanto a resistência induzida é ativada por estímulos externos, desencadeando uma resposta de defesa imediata.

A interação microbiana desempenha um papel importante dentro e fora da interação do reino, devido a uma variedade de compostos e metabólitos secundários liberados por vários microrganismos. As várias funções dos COVs correspondem à modulação das interações microrganismo-microrganismo e microrganismo-planta por meio de moléculas de sinalização, que regulam os principais processos fisiológicos (Goudjal et al., 2014; Chenniappan et al., 2018). Os COVs produzidos pertencem a várias classes (cetonas, álcoois, pirazinas, alcenos, sulfetos, benzenoides, terpenos, dentre outros).

Os organismos microbianos comunicantes podem desenvolver o controle fisiológico para a percepção e tolerância dos COVs. Assim, esses compostos atuam como mediadores de respiração ecológica, tanto intraespecíficas como interespecíficas. Isso ocorre porque a produção de COVs é influenciada por vários fatores, como o estágio de crescimento microbiano, disponibilidade de

nutrientes, umidade, pH, temperatura, entre outros (Cuthbert et al., 2018).

Vários estudos sugerem que os COVs podem inibir diferentes tipos de fitopatógenos e são considerados uma alternativa vital aos defensivos. Esses compostos não apenas controlam os fitopatógenos, mas também aumentam a taxa de sobrevivência dos microrganismos, removendo potenciais competidores, ou seja, fitopatógenos, por nutrientes. Fernando et al. (2005) mostraram a natureza antifúngica de COVs produzidos por 12 isolados de espécies de *Pseudomonas* e seu potencial uso no biocontrole de fungos fitopatogênicos, como *Sclerotinia sclerotiorum*.

Da mesma forma, duas cepas endofíticas de *Bacillus* sp. reduziram significativamente o peso e o número de estruturas vegetativas de sobrevivência a longo prazo (escleródios) de *S. sclerotiorum* (Massawe et al., 2018). Além disso, estudos in vitro e in vivo sobre COVs 2-undecanone, 2-tridecanone e heptadecane de *B. amyloliquefaciens* não apenas mostraram atividades de biocontrole (inibição da motilidade, formação de biofilme e colonização de raízes) contra o patógeno da murcha do tomate *Ralstonia solanacearum*, mas também aumentaram o estresse oxidativo (Raza et al., 2016a; Raza et al., 2016b). COVs como 1,3 pentadieno, acetoína e tiofeno produzidos por *B. amyloliquefaciens* foram eficazes no controle pós-colheita e durante o armazenamento de *Monilinia laxa* e *M. fructicola* no cultivo de cerejas, bem como durante seu armazenamento (Gotor-Vila et al., 2017).

Em condições de campo, tem sido verificada a eficácia dos COVs bacterianos contra doenças bacterianas, como é o caso do 3-pentanol emitido por *B. amyloliquefaciens*, que aumenta a resistência das plantas de pimenta contra a mancha bacteriana (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*) por vias de sinalização ácido salicílico (AS) e Jasmonato (JA) (Choi et al., 2014). Além disso, em uma mistura de 30 COVs, o tridecano mostrou-se eficaz contra *P. syringae* pv. *maculicola* estirpe ES4326 via mecanismo de indução de resistência sistêmica (Lee et al., 2012).

Os organismos, sejam eles macro ou microscópicos, possuem a capacidade de desenvolver mecanismos fisiológicos para perceber e tolerar os COVs. Sendo assim, tais compostos desempenham um papel importante como mediadores ecológicos, tanto intra como interespecíficas, abrangendo desde a comunicação entre microrganismos até a interação entre diferentes domínios.

2.5 Biofilme bacteriano

Biofilmes são populações bacterianas da mesma ou de distintas espécies que formam estruturas tridimensionais complexas, compostas por comunidades de células bacterianas envoltas em matriz aderidas a uma superfície biótica ou abiótica (Costerton, 1999).

Outra abordagem promissora para o controle de patógenos em plantas envolve a combinação de microrganismos benéficos. Essa estratégia tem sido estudada como um método eficaz no controle de doenças fitopatogênicas e pode contribuir para o fortalecimento da resistência das plantas contra esses patógenos (Rastogi et al., 2010).

Estudos têm demonstrado que algumas bactérias benéficas têm a capacidade de induzir respostas de defesa nas plantas por meio da ativação de diferentes vias de sinalização (Czerepinska; Gundel, 2021). A interação bacteriana pode ativar a síntese de compostos de defesa, como fitoalexinas e proteínas de resistência, conferindo às plantas uma resposta mais rápida e eficiente contra os patógenos.

Além disso, a combinação de microrganismos benéficos pode levar à formação de biofilmes específicos nas plantas, o que pode aumentar ainda mais a capacidade de proteção contra patógenos (Vega-Aristizábal et al., 2021). Os biofilmes formados pelas bactérias benéficas podem servir como uma barreira física contra a colonização de patógenos na superfície dos frutos.

Durante a formação do biofilme, as células transitam de um estilo de vida móvel para um estilo de vida sésil, interagindo com uma superfície e iniciando a produção de uma matriz extracelular que as mantém unidas e fixadas à superfície (Costerton, 1999). Portanto, as células que formam biofilmes são referidas como células sésseis, já as células livres não envoltas são chamadas de planctônicas (Marshall, 2006).

Comparado ao estilo de vida planctônico, o estilo de vida do biofilme confere vários benefícios às células integradoras, como proteção contra agentes antimicrobianos e predadores, tolerância a mudanças nas condições ambientais e aptidões de colonização (Yin et al., 2019). Sua formação é desencadeada por condições externas desfavoráveis, resultantes de modificações na expressão

gênica, por meio do quórum sensing (Dotto et al., 2017).

A formação de biofilmes bacterianos envolve nove etapas básicas sequenciais. Na primeira etapa, as células bacterianas planctônicas aderem a uma superfície sólida através de forças de van der Waals, forças hidrofóbicas e força eletrostática em meio aquoso. Na segunda etapa, ocorre a multiplicação celular e a produção de matriz polimérica exopolissacarídeos pelos microrganismos secundários, favorecendo a adesão das microcolônias. Nessa fase, a adesão é irreversível (Natress, 2014).

A terceira etapa envolve a preparação de estruturas de alta complexidade, seguida pela formação de um biofilme mais elaborado contendo canais para fluxo de nutrientes e excreções. A disseminação celular e a colonização subsequente de outras superfícies ocorrem na quinta etapa. Na sexta etapa, há sinalização molecular célula/célula - Quorum Sensing. Na sétima etapa, ocorre o transporte de substratos para dentro do biofilme, seguido pelo metabolismo das células aplicadas ao biofilme e transporte de produtos para fora do biofilme na oitava etapa. Finalmente, na nona etapa, o biofilme pode ser desagregado (Natress, 2014).

Quorum sensing é um processo de comunicação celular utilizado por muitas funções. Envolve a produção, liberação e detecção de moléculas sinalizadoras específicas, chamadas autoindutoras, que se acumulam no ambiente e, quando atingem uma concentração crítica, ativam a expressão de genes envolvidos em comportamentos coletivos, como a produção de biofilmes, mecanismos de biocontrole, produção de enzimas, entre outros. Esse processo é importante para a sobrevivência e adaptação das bactérias em ambientes ecológicos, bem como para o sucesso do biocontrole (Mukherjee, Bassler, 2019).

Todavia, a formação de biofilme bacteriano é uma característica importante que pode contribuir para o sucesso do biocontrole de fitopatógenos (Santos et al., 2021). Muitas bactérias diferentes formam biofilmes, mas o gênero *Pseudomonas* está entre os mais estudados por vários motivos: (1) abriga espécies com capacidade de colonizar uma grande variedade de ambientes devido à alta versatilidade metabólica e fisiológica encontrada nesse grupo de microrganismos, (2) tem relevância ecológica devido às suas interações com organismos vivos, e (3) tem aplicações biotecnológicas

potenciais (Silby *et al.*, 2011).

A formação de biofilme por *Pseudomonas* benéficas associadas a plantas desempenham papéis vantajosos tanto para a planta quanto para a bactéria. Por um lado, eles podem aumentar o rendimento da planta, melhorando a absorção de minerais e a produção de fitohormônios, induzindo a supressão competitiva de patógenos e desencadeando resistência sistêmica induzida pela planta. Além disso, esses biofilmes permitem a fixação das células a uma fonte de nutrientes e conferem proteção contra as defesas das plantas e flutuações ambientais (Danhorn, Fuqua, 2007; Rudrappa, Biedrzycki, Bais, 2008; Bogino *et al.*, 2013).

Em particular, as espécies *P. fluorescens* e *Pseudomonas chlororaphis* se destacam devido ao seu potencial uso como agentes de biocontrole, pois frequentemente contribuem para a saúde das plantas, exercendo atividades antagonistas contra patógenos (Ganeshan; Manoj Kumar, 2005; Cazorla *et al.*, 2006; Anderson; Kim, 2020). Fenótipos ligados à formação de biofilme também foram observados para favorecer as interações bactéria-planta e a atividade de biocontrole de espécies de *Pseudomonas putida* e *P. chlororaphis* (Sun *et al.*, 2017; Heredia-Ponce *et al.*, 2021).

No contexto de bactérias benéficas associadas a plantas, o *Bacillus subtilis*, uma bactéria Gram-positiva que atua como agente de biocontrole de diversos fitopatógenos, requer a produção de componentes da matriz extracelular envolvidos na formação do biofilme, como os codificados por *tapA-sipW* operons *tasA* e *epsA-O*, para a colonização das raízes das plantas e para conferir proteção às plantas (Chen *et al.*, 2013).

Bais *et al.* (2009) realizaram um estudo utilizando um isolado de *Bacillus subtilis* previamente selecionado como agente antagônico de *Pseudomonas syringae em Arabidopsis*. Observaram que a formação de biofilme pela cepa de *B. subtilis* dependia da produção de surfactina. Quando mutantes deficientes na produção de surfactina foram testados contra *Pseudomonas syringae*, a cepa mutante não forneceu proteção à planta e evoluiu em níveis elevados da bactéria fitopatogênica, semelhantes às plantas inoculadas com a bactéria fitopatogênica. Assim, concluíram que a formação do biofilme está diretamente relacionada ao biocontrole apresentado pelo *B. subtilis*.

Santos *et al.* (2021) avaliaram a capacidade de bactérias epifíticas formadoras de biofilme em controlar a antracnose nesses frutos. Observaram

que o uso combinado de bactérias reduziu significativamente o desenvolvimento da doença em frutos de mamoeiro, uma redução de cerca de 97% da antracnose.

Já Nie et al. (2022) avaliaram o efeito do tratamento com três cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* em vinhas cultivadas no campo. Baseado nos mecanismos de ação e na compatibilidade entre os isolados, misturas compostas por três bactérias foram elaboradas. A cepa TS-45, em particular, apresentou controle quase completo da infecção de bagas em videiras, evidenciando o potencial da bactéria como agente de biocontrole eficaz da antracnose da videira.

Devido às perdas ocasionadas por doenças pré e pós-colheita, é fundamental investigar o papel do biofilme na ação dos agentes de controle biológico. O controle biológico é uma estratégia que utiliza microrganismos benéficos para suprimir a população de fitopatógenos, reduzindo assim as doenças em culturas agrícolas. Esses agentes benéficos podem ser aplicados diretamente nas plantas ou no solo, visando proteger as culturas de forma sustentável e ambientalmente amigável.

O biofilme, com sua capacidade de formar estruturas tridimensionais complexas, oferece um ambiente propício para a interação entre os microrganismos benéficos e as plantas. Ao formar biofilmes nas superfícies das plantas, como os frutos, os agentes de controle biológico podem estabelecer uma relação simbiótica, proporcionando uma barreira física contra a colonização de fitopatógenos, ao mesmo tempo em que ativam respostas de defesa nas plantas hospedeiras.

Portanto, compreender o papel do biofilme na ação dos agentes de controle biológico é essencial para aprimorar as estratégias de controle de doenças nas culturas agrícolas. Esse conhecimento pode abrir novas perspectivas no desenvolvimento de produtos e tecnologias que promovam uma agricultura mais sustentável, com menor dependência de agroquímicos, e benefícios para a saúde humana e o meio ambiente.

3.0 REFERÊNCIAS

- AGROFIT - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Agrofit: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 08 mai.2023.
- ANDERSON, A.J.; KIM, Y.C. Insights into plant-beneficial traits of probiotic *Pseudomonas chlororaphis* isolates. **J. Med. Microbiol.** 2020, 69, 361–371.
- ARAUJO, Fabio Fernando de; MENEZES, Danilo. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa phytopathologica**, v. 35, p. 169-172, 2009.
- BAHADOU, Smail Ait *et al.* Novos potenciais antagonistas bacterianos para o biocontrole da doença do fogo bacteriano (*Erwinia amylovora*) em Marrocos. **Patogênese microbiana**, v. 117, p. 7-15, 2018.
- BAIS, HarshPal; FALL, Ray; VIVANCO, Jorge M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant physiology**, v. 134, n. 1, p. 307-319, 2004.
- BATISTA, L.R. *et al.* Fungicidas utilizados no controle da antracnose em mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 1, 2017.
- Bautista-banões, S., Sivakumar, D., Bello-pérez, A., Villanueva-arce, R., Hernández-lópez, M.; A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. **Postharvest Biology and Technology**, 2013.
- BENEDUZI, Anelise; AMBROSINI, Adriana; PASSAGLIA, Luciana MP. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and molecular biology**, v. 35, p. 1044-1051, 2012.
- BETTIOL, W., GHINI, R.; 3ed. Controle biológico. In: bergamin filho, A Kimati, H, Amorim, L. (Ed.). Manual de fitopatologia. v.1: Princípios e conceitos. 3ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**, 1995.
- BLOOD, Renato Rezende Young *et al.* Persimmon anthracnose: a comparative study of aggressive necrotic spots and fruit among *Colletotrichum horii* isolates in southern Brazil. **Ciência Rural**, v. 50, 2020.
- BOGINO, Pablo C. *et al.* The role of bacterial biofilm and surface components in plant-bacterial associations. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 8, p. 15838-15859, 2013.
- CARMONA-HERNANDEZ, Saul *et al.* Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: a review. **Agronomy**, v. 9, n. 3, p. 121, 2019.

- CAZORLA, Francisco M. *et al.* Biocontrol of avocado dematophora root rot by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 correlates with the production of 2-hexyl 5-propyl resorcinol. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 19, n. 4, p. 418-428, 2006.
- CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Hortifruti Brasil: mamão. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/brasil-hortifruti/mamao.aspx>. Acesso em: 28 mar. 2023.
- CHALFOUN, N. R.; CASTAGNARO, A. P.; RICCI, JC Díaz. Induced resistance activated by a culture filtrate derived from an avirulent pathogen as a mechanism biological control of anthracnose in strawberry. **Biological Control**, v. 58, n. 3, p. 319-329, 2011.
- CHANDRASEKARAN, Murugesan; PARAMASIVAN, Manivannan; SAHAYARAYAN, Jesudass Joseph. Microbial volatile organic compounds: An alternative for chemical fertilizers in sustainable agriculture development. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 42, 2022.
- CHECHI, A. *et al.* Diversity in species composition and fungicide e resistance profiles in *Colletotrichum* isolates from apples. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 158, p. 18-24, 2019.
- CHEN, Xinyi *et al.* Isolamento e caracterização de *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 para o controle biológico da podridão anelar da macieira. **Biologia e Tecnologia Pós-colheita**, v. 115, p. 113-121, 2016.
- CHEN, Yun *et al.* Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments dependson conserved genes media ting biofilm formation. **Environmental microbiology**, v. 15, n. 3, p. 848-864, 2013.
- CHENNIAPPAN, C. *et al.* Biocontrolefficiencyofnativeplantgrowthpromotingrhizobacteriaagainstrhizomerotd iseaseofturmeric. **BiologicalControl**, v. 129, p. 55-64, 2019.
- CHOI, Hye Kyung *et al.* Field evaluation of the bacterial volatile derivative 3-pentanol in priming for induced resistance in pepper. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, p. 882-892, 2014.
- CORDEIRO, Z. J. M., MATOS, A. P., KIMATI, H. Doenças do mamoeiro. In: Amorim, L. *et al.*, Manual de Fitopatologia. Ouro Fino: **CERES**. p. 497-506, 2016.
- CORTAGA, Cris Q. *et al.* Mutations associated with fungicide e resistance in *Colletotrichum* species: A Review. **Phytoparasitica**, p. 1-24, 2023.
- COSTERTON, J. William; STEWART, Philip S.; GREENBERG, E. Peter. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.
- CUTHBERT, Ross N. *et al.* Biological control agent selection under environmental change using functional responses, abundances and fecundities;

the Relative Control Potential (RCP) metric. **Biological Control**, v. 121, p. 50-57, 2018.

DANHORN, Thomas; FUQUA, Clay. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 61, p. 401-422, 2007.

DANTAS, S.A.F.; Doenças fúngicas pós-colheita em frutas de mamão e laranja: ocorrência e indução de resistência com elicitores bióticos e abióticos. **Tese (Doutorado em Fitopatologia)** -Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil, 534 2003.

DISKIN, Sonia *et al.* Fludioxonil—A potential alternative for postharvest disease control in mango fruit. **Crop Protection**, v. 124, p. 104855, 2019.

DOTTO, Cristian *et al.* O componente ativo da aspirina, o ácido salicílico, promove a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* de maneira dependente de

DUKARE, Ajinath Shridhar *et al.* Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 9, p. 1498-1513, 2019.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) *et al.* Setting of import tolerances for mandipropamid in papayas. **EFSA Journal**, v. 21, n. 1, p. e07741, 2023.

EMBRAPA, A cultura do mamão / Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. – 3. ed. rev. ampl. – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 119 p.: il. – (Coleção Plantar, 65). Disponível em: Acessado em: 08 mai. 2023.

EMBRAPA. Produção integrada de frutas. Disponível em: <https://www.embrapa.br/producao-integrada-de-frutas>. Acesso em: 07 mar. 2023.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Major tropical fruits: Preliminary results 2021**. 30 p., 2021. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cb9412en/cb9412en.pdf>. Acesso em: 08 mai. 2023.

FERNANDO, WG Dilantha *et al.* Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 955-964, 2005.

FISCHER, I.H.; *et al.* Ocorrência de antracnose em abacate, agressividade e sensibilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* a fungicidas. **Agropecuária Científica no Semiárido**, Patos-PB, v. 13, n.2, p. 130-137, 2017.

FITZELL, R.D.; PEAK, C.M. The epidemiology of anthracnose disease of mango: Inoculum sources, spore production and dispersal. **Ann. Appl. Biol.** 104, 53–59, 1984.

GANESHAN, Girija; MANOJ KUMAR, A. *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. **Journal of plant interactions**, v. 1, n. 3, p. 123-134, 2005.

- GOTOR-VILA, Amparo *et al.* Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. **Food Microbiology**, v. 64, p. 219-225, 2017.
- GOUDJAL, Yacine *et al.* Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 59-65, 2014.
- GUERRERO, Yanelis Acebo *et al.* Perspectivas del uso de bacterias rizosféricas en el control de *Pyricularia grisea* (Cooke Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 13, n. 1, p. 16-22, 2011.
- HAGGAG, W. M.; TIMMUSK, S. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 4, p. 961-969, 2008.
- HEREDIA-PONCE, Zaira *et al.* Role of extracellular matrix components in the formation of biofilms and their contribution to the biocontrol activity of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 2086-2101, 2021.
- HU, M. J., *et al.* Resistance in *Colletotrichum siamense* from peach and blueberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin. **Plant Disease**, p. 806–814, 2015.
- INCAPER. Polos de Fruticultura – Mamão. Disponível em: <<https://incaper.es.gov.br/fruticultura-mamao>> . Acesso em: 08 mai.2023.
- JAINI, Mohammad Fahrulazri Mohd *et al.* Investigating the Potential of Endophytic Lactic Acid Bacteria Isolated from Papaya Seeds as Plant Growth Promoter and Antifungal Agent. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 45, n. 1, 2022.
- KAUFRNAN, G. *et al.* Flat drops, elastic sheets, and microcapsules by interfacial assembly of a bacterial biofilm protein, BslA. **Langmuir**, v. 33, n. 47, p. 13590-13597, 2017.
- KIM, Young Soo; BALARAJU, Kotnala; JEON, Yongho. Effects of rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* APEC136 and *Bacillus subtilis* APEC170 on biocontrol of postharvest pathogens of apple fruits. **Journal of Zhejiang University Science. B**, v. 17, n. 12, p. 931, 2016.
- KLEIN, Mariana N. *et al.* Application of microorganisms, alone or in combination, to control post bloom fruit drop in citrus. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 505-512, 2013.
- KOBAYASHI, Kazuo; IWANO, Megumi. BslA (YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms. **Molecular microbiology**, v. 85, n. 1, p. 51-66, 2012.

- KUHLKAMP, Karin Tesch *et al.* Avaliação de doenças fúngicas na pré e pós colheita do mamoeiro, submetidas a diferentes fungicidas no controle químico. **Revista Ifes Ciência**, v. 8, n. 1, p. 01-09, 2022.
- LANNA FILHO, Roberto; FERRO, Henrique Monteiro; PINHO, RSC de. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.
- LOUZADA, Gisele Angélica de Souza *et al.* Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota neotropica**, v. 9, p. 145-149, 2009.
- LEE, Boyoung *et al.* Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elicitation of plants systemic defense by a C13 volatile produced by *Paeni bacillus polymyxa*. **PloSone**, v. 7, n. 11, p. e48744, 2012.
- LOKARE, Priya; FATIMA, Sumia; JAGDALE, P. E. A review on the management practices of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. causes anthracnose disease of mango. **Int. J. Botany Stud**, v. 6, p. 742-746, 2021.
- LOPES, Marcos Roberto *et al.* *Saccharomyces cerevisiae*: a novel and efficient biological control agent for *Colletotrichum acutatum* during pre-harvest. **Microbiological research**, v. 175, p. 93-99, 2015.
- LOUZADA, Gisele Angélica de Souza *et al.* Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota neotropica**, v. 9, p. 145-149, 2009.
- MAPA. Valor Bruto da Produção Agropecuária. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/monitoramento-e-avaliacao/vbp-1/vbp-agropecuaria>. Acesso em: 09 mar. 2023.
- MARQUES, Paula Cristina Mendes Nogueira *et al.* Caracterização de perdas na comercialização de frutas tropicais. 2019.
- MARSHALL, Katrina *et al.* Effect of marine bacterial isolates on the growth and morphology of axenic plantlet of the green alga *Ulva linza*. **Microbial ecology**, v. 52, p. 302-310, 2006.
- MASSAWE, Venance Colman *et al.* Volatile compounds of endophytic *Bacillus* spp. have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 108, n. 12, p. 1373-1385, 2018.
- MENDES, B.M.J. *et al.* **Estimativa das Perdas na Agricultura Brasileira Causadas por Doenças de Plantas**. Brasília: CNPq, 2014. Disponível em: <https://www.cnpq.br/documents/10157/6d08a6de-8c14-4551-9ef9-071d1b0a8f74>. Acesso em: 09 mar. 2023.
- MOHAMMED, Bari L. *et al.* Biological control of *Fusarium* wilt in tomato by endophytic rhizobacteria. **Energy Procedia**, v. 157, p. 171-179, 2019.
- molecular. **Microbiol Mol Biol Rev** 64 : 847-867, 2005.

MUKHERJEE, Sampriti; BASSLER, Bonnie L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 371-382, 2019.

NATTRESS, F. M. Biofilm formation. 2014.

NATTRESS, F.M.; Biofilm formation, (2014). Newman, K.L., Almeida, R.P.P., Purcell, A.H, Lindow, S.E.; Uso de uma cepa verde fluorescente para análise da colonização por *Xylella fastidiosa* de *Vitis vinifera* .**Appl Environ Microbiology** 69: 7319-7327, 2003.

NIE, Lin-Jie *et al.* Biofilm: New insights in the biological control of fruit swith *Bacillus amyloliquefaciens* B4. **Microbiological Research**, v. 265, p. 127196, 2022.

PEI, D. *et al.* Endophytic *Bacillus subtilis* P10 from *Prunus cerasifera* as a biocontrol agent against tomato *Verticillium* wilt. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2021.

PERFECT, Sarah E. *et al.* Colletotrichum: a model genus for studies on pathology and fungal–plant interactions. **Fungal genetics and Biology**, v. 27, n. 2-3, p. 186-198, 1999.

PUJER, Parvati *et al.* Management of Postharvest Anthracnose Disease of Papaya (*Carica papaya*) Using Antagonistic Microorganisms. **International Journal of Environment and Climate Change**, v. 12, n. 11, p. 2662-2673, 2022.

RAFIQUE, M. *et al.* Bacterial biofilm formation and its role against agricultural pathogens. **The battle against microbial pathogens: Basic Science, Technological advances and educational programs. Spain: Form a tex research Center**, p. 373-382, 2015.

RAZA, Waseem *et al.* Effects of volatil e organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 7639-7650, 2016.a

RAZA, Waseem *et al.* Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.b

RUDRAPPA, Thimmaraju; BIEDRZYCKI, Meredith L.; BAIS, Harsh P. Causes and consequences of plant-associated biofilms. **FEMS microbiology ecology**, v. 64, n. 2, p. 153-166, 2008.

SAFDARPOUR, Fahime; KHODAKARAMIAN, Gholam. Avaliação das atividades antagonistas e promotoras do crescimento de plantas de bactérias endofíticas do tomate em desafio com *Verticillium dahliae* em condições *in vitro* e *in vivo*. **Biological Journal of Microorganism** , v. 7, n. 28, pág. 77-90, 2018.

- SALOMÃO, L.C.C.; Cultivo do mamoeiro. Viçosa: **Editora UFV**, 74p, 2007.
- SANTOS, L. A. D. L., PINHEIRO, L. R. B., ROCHA, L. D. S., BRAGANÇA, C. A. D., & SILVA, H. S. A. Biocontrole da antracnose em frutos de mamoeiro por bactérias epifíticas formadoras de biofilme. **Summa Phytopathologica**, 47, 45-53, 2021.
- SCHALCHLI, H. *et al.* Fungal volatiles: an environment ally friendly tool to control pathogenic microorganisms in plants. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 144-152, 2016.
- SEIDL, Verena. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 1, 2008.
- SHIMSHONI, Jakob A. *et al.* Postharvest fungicide for avocado fruits: antifungal efficacy and peel to pulp distribution kinetics. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 124, 2020.
- SILBY, Mark W. *et al.* Pseudomonas genomes: diverse and adaptable. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 4, p. 652-680, 2011.
- SPADARO, Davide; DROBY, Samir. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Science & Technology**, v. 47, p. 39-49, 2016.
- SUN, Dongling *et al.* Identification of a Pseudomonas putida as biocontrol agent for tomato bacterial wilt disease. **Biological Control**, v. 114, p. 45-50, 2017.
- TALHINHAS, Pedro; BARONCELLI, Riccardo. *Colletotrichum* species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. **Fungal Diversity**, v. 110, n. 1, p. 109-198, 2021.
- THOKCHOM, Elizabeth *et al.* Root colonization by host-specific rhizobacteria alter sindi genous root endophyte and rhizosphere soil bacterial communities and promotes the growth of mandarin orange. **European Journal of Soil Biology**, v. 79, p. 48-56, 2017.
- VALENZUELA, N.L., *et al.* Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. On maradol papaya fruit, **Biological Control**, 2015.
- VIEIRA, W. A. S. *et al.* First report of papaya fruit anthracnose caused by *Colletotrichum brevisporum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n. 12, p. 1659-1659, 2013.
- VIEIRA, W. A. S. *et al.* The impact of phenotypic and molecular data on the inference of *Colletotrichum* diversity associated with Musa. **Mycologia**, v. 109, n. 6, p. 912-934, 2017.
- VILAPLANA, Rosa *et al.* Combination of hot water treatment and chitosan coating to control anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) during the

postharvest period. **Crop Protection**, v. 128, p. 105007, 2020.

YADRAVI, Reshma N. *et al.* Effect of Antagonistic Microorganisms on Extension of Shelf-life and Physiochemical Properties of Papaya (*Carica papaya*) var. Red Lady. **International Journal of Environment and Climate Change**, v. 12, n. 11, p. 2629-2634, 2022.

Yin, W.; Wang, Y.; Liu, L.; He, J. Biofilms: The microbial "protective clothing" in extreme environments. **Int. J. Mol. Sci.** 20, 3423,2019.

YU, Sang-Mi; LEE, Yong Hoon. Genes involved in nutrient competition by *Pseudomonas putida* JBC17 to suppress green mold in postharvest satsuma mandarin. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 898-906, 2015.

ZAKARIA, Latiffah. Diversity of Colletotrichum species associated with anthracnose disease in tropical fruit crops—A review. **Agriculture**, v. 11, n. 4, p. 297, 2021.

CAPÍTULO 1

BIOPROTEÇÃO DE FRUTOS DE MAMÃO À ANTRACNOSE COM USO COMBINADO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Artigo a ser submetido à **Revista Journal of Food Science and Technology**

BIOPROTEÇÃO DE FRUTOS DE MAMÃO À ANTRACNOSE COM USO COMBINADO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

RESUMO GERAL

Este estudo teve como objetivo avaliar o controle da antracnose em frutos de mamão por meio da aplicação de bactérias endofíticas, que são causadas por *Colletotrichum brevisporum* nos frutos de mamão, bem como analisar o tempo de prateleira. Das 224 bactérias presentes na coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Mandioca e Fruticultura, apenas 12 delas não apresentaram crescimento a 37°C. As bactérias foram caracterizadas com base nos mecanismos de ação sobre *C. brevisporum*. Com base nesses mecanismos de ação e na compatibilidade entre os isolados, foram elaborados "Mixes" compostos por três bactérias, sendo eles: "Mix 1 (794, 898, 929)", "Mix 2 (768, 794, 929)" e "Mix 3 (794, 898, 768)". Eles foram ajustados para uma concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹ nos frutos, aplicados de forma preventiva, concomitante e curativa. Todos os "Mixes" reduziram significativamente a antracnose nos frutos em comparação ao controle (apenas *C. brevisporum*). Os "Mixes" 1, 3 e 2 reduziram a doença em até 49,34%, 35,25% e 33,34%, respectivamente. Em relação ao controle químico, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. O "Mix" 1 foi aplicado em frutos inteiros, e sua eficácia de tratamento foi comparada ao fungicida sintético Nativo (Trifloxistrobina 100 g/L | Tebuconazol 200 g/L) (antes, durante e concomitantemente), sem diferença significativa. Os "Mixes" bacterianos não diferiram significativamente do fungicida, que alcançou níveis de redução da doença superiores a 96%. O "Mix" 1 reduziu a severidade da antracnose em mais de 89%. Além disso, verificou-se que o "Mix" 1 aumentou a vida útil dos frutos. Mesmo após 15 dias da aplicação das misturas bacterianas, os frutos permaneceram firmes e consistentes, diferindo da testemunha que amadureceu completamente em 10 dias. As bactérias foram identificadas como (*Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter spp.* e *Chryseobacterium spp.*).

Palavras-chave: *C. brevisporum*, biocompostos voláteis, bioproteção de frutos, mix bacteriano.

BIOPROTECTION OF PAPAYA FRUITS AGAINST ANTHRACNOSE USING A COMBINED APPROACH OF ENDOFITIC BACTERIA

GENERAL ABSTRACT

This study aimed to evaluate the control of anthracnose in papaya fruits through the application of endophytic bacteria caused by *Colletotrichum brevisporum* in papaya fruits, as well as shelf life. Among the 224 bacteria from the collection of the Soil Microbiology Laboratory at Embrapa Mandioca and Fruticultura, only 12 of them did not show growth at 37°C. The bacteria were characterized based on their action mechanisms against *C. brevisporum*. Based on these action mechanisms and compatibility among the isolates, Mixes composed of three bacteria were prepared, namely: "Mix 1 (794, 898, 929)", "Mix 2 (768, 794, 929)", and "Mix 3 (794, 898, 768)". They were adjusted to a concentration of 10⁸ CFU mL⁻¹ in the fruits, applied preventively, concomitantly, and curatively. All the Mixes significantly reduced anthracnose in the fruits compared to the control (only *C. brevisporum*). Mixes 1, 3, and 2 reduced the disease by up to 49.34%, 35.25%, and 33.34%, respectively. Regarding chemical control, there were no significant differences between the treatments. Mix 1 was applied to whole fruits, and its treatment efficacy was compared to the synthetic fungicide Nativo (Trifloxystrobin 100 g/L | Tebuconazole 200 g/L) (before, during, and concomitantly), with no significant difference. The bacterial Mixes did not differ significantly from the fungicide, which achieved disease reduction levels higher than 96%. Mix 1 reduced anthracnose severity by over 89%. Furthermore, it was observed that Mix 1 increased the shelf life of the fruits. Even after 15 days of applying the bacterial mixtures, the fruits remained firm and consistent, unlike the control group, which fully ripened in 10 days. The bacteria were identified as (*Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., and *Chryseobacterium* spp.).

Keywords: *Colletotrichum brevisporum*, volatile biocompounds, fruit bioprotection, bacterial mixes.

1.0 INTRODUÇÃO

O mamão (*Carica papaya* L.) é uma fruta de grande importância econômica no Brasil, sendo uma das principais culturas frutíferas do país. Devido à sua natureza climatérica, que resulta em um rápido processo de maturação após a colheita, o fruto é altamente suscetível a injúrias físicas, que por sua vez favorecem doenças fúngicas pós-colheita como antracnose (VILAPLANA *et al.*, 2020).

Dentre as principais doenças que acometem os frutos na pós-colheita, a antracnose destaca-se por limitar a vida útil dos frutos durante o armazenamento, o transporte e a comercialização. A antracnose causada por fungos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* spp. que iniciam a infecção ainda na floração permanecem latentes, os sintomas da doença após a colheita, durante o armazenamento, transporte e comercialização (TALHINHAS e BORONCELLI, 2021).

Os sintomas da antracnose, na superfície dos frutos de mamão, consistem em lesões necróticas, arredondadas e deprimida no centro. A antracnose interfere diretamente na qualidade dos frutos, resultando em perdas na produção e depreciação no valor de mercado.

Para reduzir os efeitos da doença os exportadores geralmente recorrem a fungicidas sintéticos para prolongar a vida pós-colheita (Fernandes, Santos, Ribeiro, 2002). Considerando os riscos associados ao uso de fungicidas para a saúde humana e meio ambiente, bem como a perda de eficácia desses produtos devido à resistência de patógenos, a cadeia produtiva do setor agrícola tem buscado outros métodos de controle de doenças (Cortaga *et al.*, 2023).

Portanto, é crucial adotar medidas preventivas, como o controle biológico, a fim de minimizar as perdas, o uso de defensivos na pré e pós-colheita, e garantir a qualidade do mamão para os consumidores.

As bactérias possuem um elevado potencial de uso como agentes de biocontrole de doenças em pós-colheita. Variados mecanismos de ação bacteriano têm sido descritos no controle agentes fitopatogênicos (Bahadou *et al.*, 2018; Thokchom *et al.*, 2017) notadamente competição por espaço e nutrientes, parasitismo, compostos difusíveis, voláteis e biofilmes, entre outros.

A combinação de microrganismos também tem sido investigada como uma forma de potencializar o biocontrole de doenças de plantas.

Assim sendo os objetivos do trabalho foi avaliar a combinação de bactérias endofíticas do mamão no controle da antracnose causada por *C. brevisporum*

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção dos isolados

As bactérias selecionadas foram isoladas por Santos *et al.* (2021) a partir de material vegetal de mamoeiros que exibiam bom aspecto fitossanitário, de pomares caseiros, do centro de abastecimento do município de Feira de Santana, da unidade experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura, e dos mamoeiros do Campus da UFRB em Cruz das Almas, sem histórico de doença. O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo e Resíduos Orgânicos da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Tabela 1).

Tabela 1: Isolados endofíticos de mamoeiro, selecionados quanto à produção de compostos antimicrobianos difusíveis, voláteis, quitinase e inibição da germinação de conídios de *C. brevisporum*.

ISOLADOS	MECANISMO DE AÇÃO	CRESCIMENTO 37°C	BIOFILME	ANTIBIOSE	FRAGMENTO
632	Compostos voláteis	-	+	-	Folha
642	Compostos voláteis	-	+	-	Folha
643	Compostos voláteis	-	+	-	Folha
743	Compostos voláteis	-	+	-	Folha
755	Compostos voláteis e inibição da germinação de conídios	-	+	-	Folha
768	Compostos voláteis e inibição da germinação de conídios	-	+	-	Polpa

794	Compostos difusíveis, voláteis e quitinase	-	+	-	Polpa
853	Compostos voláteis	-	+	-	Talo
892	Compostos voláteis	-	+	-	Talo
898	Compostos voláteis e quitinase	-	+	-	Semente
925	Compostos voláteis	-	+	-	Polpa
928	Compostos voláteis	-	+	-	Polpa
929	Compostos voláteis	-	+	-	Polpa

Santos et al. (2021) conduziram um estudo no qual prospectaram e isolaram 224 bactérias provenientes do filoplano do mamão. Todas essas bactérias foram submetidas a testes para avaliar sua capacidade de inibir o crescimento do fungo *C. brevisporum* "in vitro". Avaliou-se a produção de compostos antimicrobianos difusíveis e voláteis, bem como a capacidade de produzir quitinase e inibir a germinação de conídios.

De forma notável, todas as 224 bactérias estudadas mostraram-se capazes de produzir compostos voláteis em concentrações distintas. Além disso, os pesquisadores avaliaram o crescimento dessas cepas a uma temperatura de 37 °C. Após uma análise criteriosa, 12 bactérias foram selecionadas para prosseguir com a investigação.

2.2 Extração e análise de gDNA | PCR | Sequenciamento de amplicon

O DNA genômico (gDNA) foi extraído dos isolados bacterianos (768,798,898,929) estes quem constituíram os "mix" utilizados no estudo, foram mantidos em 'solução estabilizante' para extração com kit de Extração De DNA Genômico 50 Preparações, conforme as recomendações do fabricante. O gDNA foi submetido à verificação da integridade (eletroforese em gel de agarose 1%), pureza e concentração (*Nano Drop 2000*, ThermoScientific).

O 16S rDNA é um marcador universal para a identificação de gêneros bacterianos (WRIGHT e BAUM, 2018; YARZA *et al.*, 2014). Para a reação em cadeia da DNA polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), foram utilizados 20 ng de gDNA *TaqDNA polymerase*, 10 X PCR *Buffer*, MgCl₂, dNTPs e os seguintes *primers*: 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') e 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). A reação de PCR foi executada em um termociclador *LGC XP Cycler* com uso de controles positivos e negativos para a PCR. O programa de ciclagem foi executado a 94 °C por 5 min, seguido por 37 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 10 seg e 72 °C por 1 min, com uma etapa final a 72 °C por 5 min.

2.3 Antibiose recíproca

Com o intuito de investigar o potencial do uso combinado de antagonistas, foi realizado um ensaio de antibiose recíproca entre 12 isolados bacterianos (632, 642, 643, 743, 755, 768, 794, 853, 892, 898, 912, 925 e 929). Esses isolados foram selecionados por apresentarem pelo menos um mecanismo de ação contra *C. brevisporum*, além de não crescerem a 37°C.

Utilizou-se o teste da camada dupla, seguindo a metodologia de Romeiro (2007). Inicialmente, os isolados foram semeados em placas de Petri contendo meio NA e distribuídos em 10 pontos equidistantes na superfície do meio de cultura. Em seguida, foram adicionados 5 µL de suspensão bacteriana em cada ponto e as placas foram incubadas a 28°C por 24 horas.

Após esse período, adicionou-se 1,0 mL de clorofórmio na tampa de cada placa e mesmas foram incubadas por 20 minutos. Após a evaporação do clorofórmio, foram adicionados 0,1 mL de suspensão aquosa de células do isolado em cada ponto, sobre as colônias mortas. As placas foram incubadas a 28°C e examinadas após 24 horas para verificação da presença de halos de passagem. A presença de halos indicava uma incompatibilidade entre os isolados bacterianos, restringindo as combinações possíveis.

2.4 Avaliação *in vitro* da capacidade de formação de biofilme

Foram avaliados os doze isolados previamente utilizados no teste quanto à sua capacidade de formação de biofilme em placas de ELISA ou microtitulação contendo meio MMS, composto por K_2HPO_4 (7 g L⁻¹), KH_2PO_4 (2 g L⁻¹), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2 g L⁻¹), $(NH_4)_2SO_4$ (1 g L⁻¹), glicerol (4 g L⁻¹) e $CaCl_2$ (1 mmol L⁻¹). Inicialmente, os isolados foram cultivados em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) por aproximadamente 18 horas a 26 °C, seguidos de centrifugação a 4300 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1,5 mL de solução salina esterilizada 0,85%, seguida de nova centrifugação nas mesmas condições. Após esta etapa, o sobrenadante foi novamente descartado e a densidade ótica das células foi padronizada para obter uma população equivalente a 1×10^8 UFC mL⁻¹.

Em seguida, alíquotas de 20 µL dessa suspensão foram adicionadas a 180 µL de meio 1045 mínimo de sais - MMS, contidas em placas de microtitulação de 96 poços, em octuplicata. As microplacas foram incubadas a 26 °C por 24, 48 ou 72 h e o meio de cultura contendo células não aderidas foi removida. As células aderidas aos micropoços foram coradas por 30 min com 200 µL de cristal violeta a 0,1% em água destilada. Em seguida, o corante foi removido e os poços foram lavados consecutivamente e delicadamente, por três vezes, com 200 µL de água destilada. As placas foram secas em estufa a 40 °C por 15 minutos. O cristal violeta retido em cada poço foi diluído em 200 µL de etanol (95%) e a absorbância quantificada a 600 nm em leitor de ELISA. O delineamento inteiramente casualizado em oito repetições por isolado. As leituras das densidades óticas obtidas foram relacionadas à aderência das células bacterianas à placa de microtitulação e, maior capacidade de formação de biofilme.

2.5 Avaliação da redução da antracnose frutos inteiros

Quantificou-se a redução da antracnose em de frutos mamoeiro tratados com agentes bacterianos. Foram três combinações de isolados, a partir de doze antagonistas selecionados nos ensaios anteriores, que apresentavam ao menos um mecanismo de ação, ausência de crescimento em 37 °C e compatibilidade para uso combinado. Às combinações chamou-se de "Mix". Cada "Mix" foi montado distribuindo os isolados de forma a equilibrar os mecanismos de

biocontrole de cada agente (Tabela 2). O isolado 794 foi utilizado em todos os “Mix” por expressar três mecanismos de ação avaliados, mesmo produzindo menos biofilme quando comparados aos outros isolado.

Tabela 2: Composição dos “Mix” bacterianos aplicados em frutos de mamão

MIX 1	MIX 2	MIX 3
794	768	794
898	794	898
929	929	768

Frutos de mamão do grupo formosa, variedade Tainung 01, sadios e colhidos em estágio de maturação comercial 1, foram limpos em água corrente, em seguida desinfestados por meio da imersão em álcool 70% por 1 min, hipoclorito de sódio 2 %, por 3 min, lavados com água esterilizada, sendo secos ao ar.

Avaliaram-se os três “Mix”, realizou-se a inoculação do *C. brevisporum* por disco de micélio nos três pontos de inoculação e ainda o fungicida Nativo® (Trifloxistrobina 100 g/L | Tebuconazol 200 g/L), a fim de verificar o potencial de biocontrole dos “Mix” utilizados, e eficiência deles, quando comparados ao agroquímico. O experimento foi realizado com frutos de mamão no estágio 1 de desenvolvimento, considerando a presença de ferimentos. Os frutos foram tratados imergindo-se suspensão aquosa dos antagonistas (10^8 UFC mL⁻¹), em combinações de isolados (Mix “1”, “2”, “3”).

A seguir, procedeu-se à inoculação com dois métodos distintos. O primeiro por suspensão de conídios de *Colletotrichum* spp. (1×10^6 conídios. mL⁻¹). Os frutos sofreram uma injúria de 3 mm de diâmetro em sua casa previamente à inoculação. O segundo a fim de verificar um novo método de inoculação, utilizou-se discos de micélio do patógeno de 2mm inoculados no fruto em pontos equidistantes. Após as operações descritas os frutos foram acondicionados em caixas plásticas de 10 L, sobre papel de filtro umedecido, e mantidos à temperatura ambiente por sete dias. Decorrido este intervalo, a área lesionada foi mensurada nos frutos, por meio da análise de imagens, utilizando o software Assess 2.0 (Image analysis software for plant disease quantification)

APS – American Phytopatological Society (LAMARI,2002). O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado. O controle positivo foi composto por frutos inoculados apenas com o patógeno e negativo com frutos tratados apenas com água destilada. A comparação das médias de área lesionada foi realizada pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico Sisvar.

2.6 Avaliação do melhor tempo de aplicação dos Mix bacterianos em frutos inteiros

Avaliou-se a eficácia do "Mix 2" em três momentos distintos de aplicação (antes da inoculação do patógeno, após a inoculação e simultaneamente à inoculação) em comparação ao fungicida convencional no controle da antracnose em frutos de mamoeiro também avaliado nos mesmos tempos. Foram realizadas as mesmas condições de higiene e lesões em todos os frutos utilizados no experimento, que foram inoculados com discos de micélio do patógeno. Decorrido este intervalo, a área lesionada foi mensurada nos frutos, por meio da análise de imagens, utilizando o software Assess 2.0 (Imageanalysis software for plant disease quantification) APS – American Phytopatological Society. O ensaio foi conduzido em DIC com três repetições, sendo cada fruto com três lesões. Após sete dias de incubação, as áreas lesionadas foram mensuradas e a média das três áreas lesionadas foi calculada para cada fruto, obtendo a média das três áreas lesionadas, e os dados foram comparados pelo teste de Tukey 5%

2.7 Análise do tempo de prateleira

Vislumbrando investigar a eficácia do "Mix 1" como um fungicida biológico, foi realizado um estudo para comparar o tempo de prateleira dos frutos tratados com o mix 1 em relação aos frutos não tratados. A avaliação do tempo de prateleira foi feita utilizando a escala de cores da cascata do mamão, que é uma escala visual que varia de 1 a 6, sendo que o estágio 1 corresponde ao fruto totalmente verde e o estágio 6 corresponde ao fruto maduro. Para o estudo, foram utilizados frutos no estágio 1 de desenvolvimento que não estavam

infectados com o patógeno. A avaliação foi realizada após 7 e 15 dias da inoculação do “Mix 2” nos frutos.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção dos isolados

Esse estudo revela a presença de uma variedade significativa de bactérias com potencial para inibir o crescimento do fungo *C. brevisporum*. As bactérias selecionadas demonstraram habilidades promissoras na produção de compostos antimicrobianos voláteis, o que pode representar uma estratégia promissora para o controle de doenças fúngicas em frutos de mamão na pós-colheita.

Dos 224 isolados avaliados apenas 12 foram negativos para o crescimento em 37 °C. O não crescimento de bactérias isoladas a 37 °C é uma prática comum na seleção de microrganismos para produção de fungicidas biológicos, uma vez que a temperatura corporal humana é de 36-37 °C. A ideia é evitar que microrganismos que possam causar intoxicação em humanos, principalmente em pessoas imunocomprometidas, sejam usados na produção de biofungicidas. Essa prática também é importante para atender aos requisitos de segurança alimentar e ambiental. As bactérias foram identificadas em nível de espécie em: *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Chryseobacterium* spp. (Tabela 3)

Tabela 3: Identificação taxonômica dos isolados de acordo com as consultas realizadas utilizando alinhamentos de sequências em bancos de dados referência para gene 16S rRNA, GenBank (BLASTn).

Bactérias	Identificação	Código Genbak	% similaridade
768	<i>Enterobacter hormaechei</i>	158836	100%
794	<i>Pseudomonas geniculata</i>	111099	99%
898	<i>Bacillus albus</i> N35-10-2	(MAOE0100008)	100%
929	<i>Chryseobacterium camelliae</i>	MG744645.1	100%

Todos os isolados foram avaliados quanto à capacidade de sintetizar compostos antimicrobianos voláteis. A produção destes compostos de forma isolada, inibindo *C. brevisporum* foi verificada para sete bactérias. Seguiu-se a produção compostos difusíveis e quitinase um isolado cada, e a supressão da germinação de conídios três isolados.

Doze isolados, ou seja, 5,37 % do total não cresceu a 37 °C e exibiram ao menos um mecanismo de ação, o que é desejável na seleção de antagonistas, pois amplia as chances de sucesso no biocontrole e a segurança no uso de bactérias como outro método ao controle de doenças fitopatogênicas. Dentre estes, uma exibiu 3 mecanismos de ação e nenhum deles exibiu todos os mecanismos e foi negativa (Figura 1).

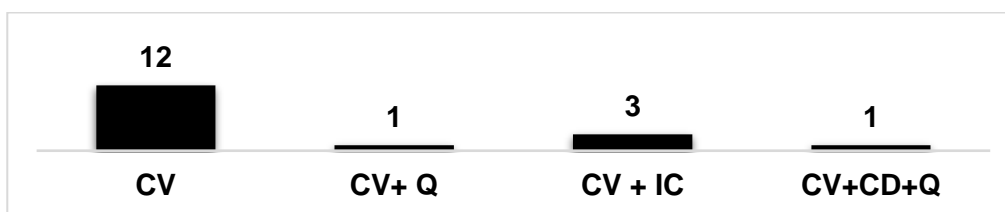


Figura 1: Disposição dos mecanismos de ação presentes em antagonistas bacterianos endofíticos de mamoeiro. CV; compostos voláteis, CD; compostos difusíveis, Q; quitinase, IC; Inibição da germinação de conídios).

3.2 Antibiose por difusão em dupla camada

Por meio do ensaio, foi possível observar que todos os isolados foram compatíveis, uma vez que nenhum foi inibido na presença do outro, não havendo halo de inibição ao redor da colônia (Figura 2). Este resultado é de extrema importância para assegurar a eficácia do tratamento combinado e ampliar as possíveis combinações, visto que a presença de incompatibilidade entre os antagonistas poderia resultar em redução da atividade antifúngica e, conseqüentemente, comprometer a eficácia do tratamento.

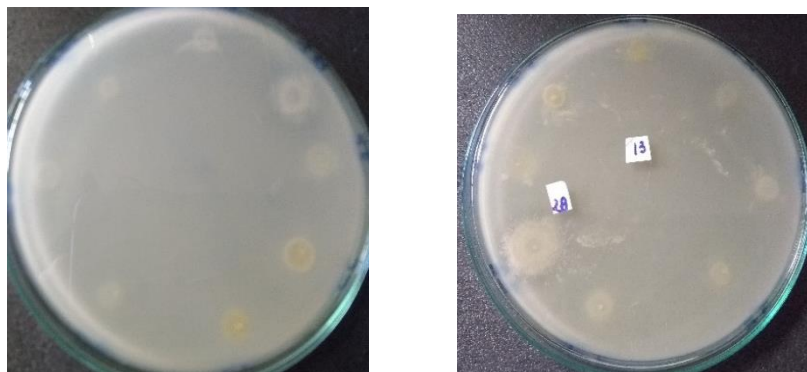


Figura 2: Avaliação da compatibilidade entre os antagonistas endofíticos de mamoeiro por meio da de antibiose recíproca. A ausência de halos ao redor das colônias indica compatibilidade entre os isolados.

3.4 Avaliação *in vitro* da capacidade de formação de biofilme das bactérias endofíticas

Na avaliação da capacidade de adesão das células em ELISA de todos os isolados, foi constatado que todos demonstraram habilidade em aderir às superfícies da placa de microtitulação. Entretanto, ao analisar a produção de biofilme em diferentes tempos de incubação, observou-se uma variação significativa entre os isolados. Os resultados indicaram que as bactérias 898, 768, 912 e 928 apresentaram a maior quantidade de células aderidas nos poços da placa de microtitulação, sugerindo, assim, uma maior capacidade de agregação celular. Além disso, verificou-se um rápido aumento na produção do biofilme após 24 horas, seguido de uma redução drástica após 48 horas. Essa diminuição pode ser explicada pelo esgotamento dos nutrientes presentes no meio de cultura utilizado para o crescimento das bactérias (Figura 3).

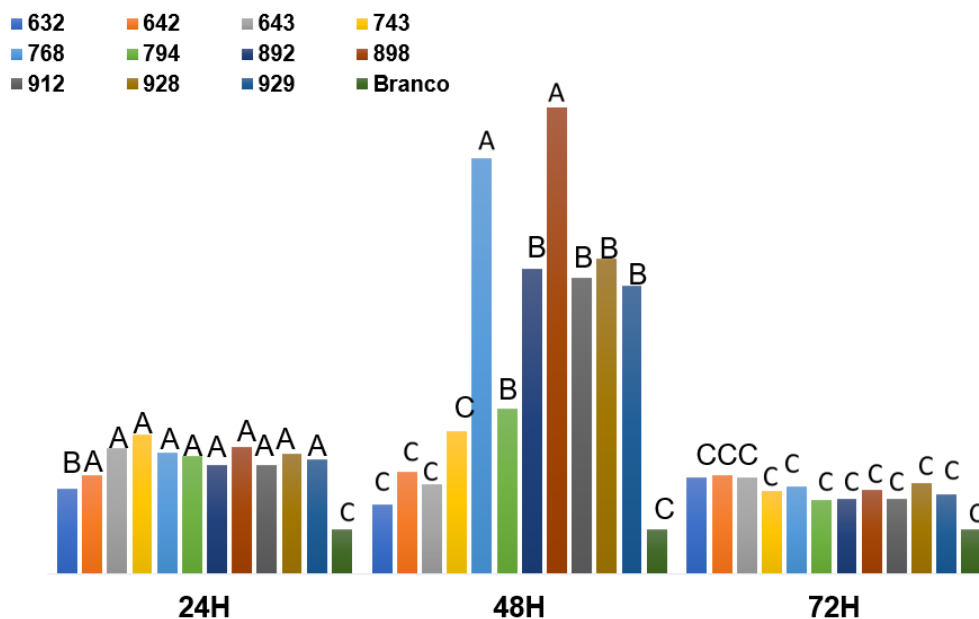


Figura 3: Avaliação da formação de biofilme bacteriano por isolados endofíticos antagonistas a *C. brevisporum* em placa de ELISA, por meio da leitura de absorbância a 600 nm, durante o período de 24/48/72 horas em meio mínimo de sais.

*Tratamentos seguidos da mesma letra não apresentam diferença significativa.

3.5 Avaliação da redução da antracnose em frutos inteiros

Após sete dias de incubação a 25 °C, verificou-se que todos os "Mix" dos antagonistas reduziram significativamente a doença. Embora não tenham apresentado diferença em relação ao tratamento com a aplicação do fungicida Nativo (Trifloxistrobina 100 g/L | Tebuconazol 200 g/L), que é o método mais utilizado no controle da antracnose em mamoeiro, obtendo um índice de controle de 69,61%. Os "Mix" 1, 3 e 2 exibiram áreas lesionadas de 50,66%, 60,75% e 66,66%, respectivamente (Figura 4).

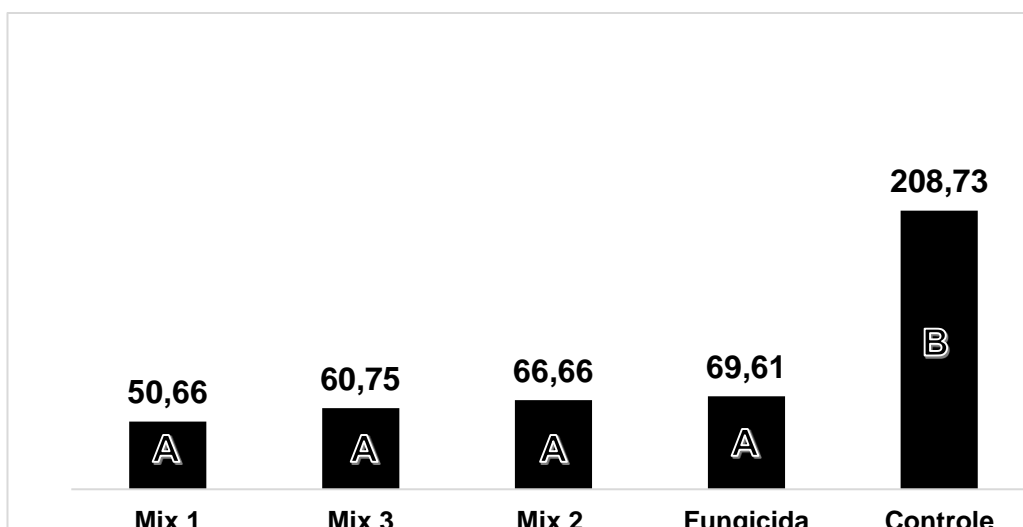


Figura 4: - Porcentagem de redução da área lesionada por *C. brevisporum* em frutos de mamão.

*Tratamentos seguidos da mesma letra não apresentam diferença significativa.

Também foi observado que não houve diferença significativa quanto ao método utilizado para a inoculação do patógeno. Após a avaliação do controle do patógeno em frutos tratados com os "Mix", foi observado um efeito adicional na manutenção da consistência e ausência de sinais de maturação. Isso sugere a possibilidade de que esses "Mix" possam atuar também na regulação da maturação dos frutos, possivelmente por meio da ativação da via do jasmonato. A ativação dessa via pode inibir a produção de etileno, um hormônio vegetal importante na regulação da maturação dos frutos. Sabe-se que o etileno é produzido naturalmente pelos frutos durante o processo de maturação, levando à perda de consistência e mudança de cor, e contribuindo para a redução da qualidade durante o armazenamento.

Assim, o efeito dos "Mix" na inibição da via do etileno pode ajudar a preservar a qualidade dos frutos durante o armazenamento, prolongando sua vida útil. É importante destacar que a regulação da maturação é um processo complexo, que envolve a ativação de diferentes vias hormonais e a interação com fatores ambientais. Portanto, são necessários estudos mais aprofundados para elucidar o mecanismo exato pelo qual os "Mix" atuam na regulação da maturação dos frutos e avaliar sua efetividade em diferentes condições de armazenamento.

3.5 Avaliação do tempo de aplicação dos Mix bacterianos em frutos inteiros

Observou-se que o "Mix 1" não diferiu significativa da comparação ao fungicida convencional, independentemente do momento de aplicação. Além disso, verificou-se que a aplicação preventiva do "Mix 1" (antes da inoculação), assim como aplicação simultânea à inoculação apresentou não diferiram estatisticamente. Esses resultados indicam que o "Mix 1" pode ser utilizado tanto preventiva quanto curativamente para o controle da antracnose em frutos de mamoeiro, sendo uma alternativa ao fungicida convencional.

3.6 Análise do tempo de prateleira

Neste estudo, foi possível avaliar a eficácia do mix 1 como um fungicida biológico e verificar o tempo de prateleira dos frutos tratados em relação aos não tratados. Utilizando uma escala de núcleos do mamão, observou-se que os frutos tratados com o mix 1 mantiveram-se em um estágio mais verde e firme após 7 e 15 dias de avaliação, em comparação com os frutos não tratados.

Durante o estudo, constatou-se que os frutos tratados com o mix 1 mantiveram sua firmeza por até 15 dias, indicando que o produto pode efetivamente interferir no processo de maturação. Após esse período, os frutos foram lavados para remover qualquer resíduo bacteriano e, a partir daí, notou-se que a maturação foi retomada.

Cabe destacar que, mesmo após a interrupção do uso do mix 1, os frutos tratados mantiveram-se por mais tempo na prateleira do que o grupo controle, que amadureceu completamente em apenas 10 dias, enquanto os frutos tratados com o mix 1 chegaram nesse estágio após 15 dias. Esses resultados evidenciam a eficácia do mix 1 como fungicida biológico no prolongamento do tempo de armazenamento e na manutenção da qualidade dos frutos durante o período de armazenamento.

Os antagonistas microbianos foram aplicados diretamente na fruta por imersão em solução. A supressão de *C. brevisporum* não exibiu diferença significativa quando comparada ao fungicida Nativo (Trifloxistrobina 100 g/L | Tebuconazol 200 g/L).

Em geral, a maioria dos microrganismos antagonistas é isolada da superfície da fruta, planta (raízes, folhas, flores e sementes), mar ou solo (Teixeira et al., 2013). As bactérias antagônicas utilizadas neste estudo são endofíticas, oriundas das sementes, talo e fragmentos de fruto, e produziram vários metabólitos com capacidades antifúngicas e antibacterianas.

Nos últimos anos, várias cepas dos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* têm sido estudadas e utilizadas de forma eficaz no tratamento de doenças causadas por fitopatógenos. A supressão do crescimento fúngico do *Colletotrichum* spp. foi alcançada usando espécies bacterianas antagônicas, como *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Burkholderia* sp., *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans* e *Serratia plymuthica* (Fu et al., 2010).

As comunidades bacterianas apresentam efeitos antagônicos aos fitopatógenos, podendo ser exploradas como uma forma de controle biológico. Existe uma interação contínua no mundo biológico entre os fitopatógenos e seus antagonistas, de forma que estes inibem a presença e o desenvolvimento do patógeno e, conseqüentemente, de doenças. Para o uso adequado desse tipo de microrganismo, é importante entender os mecanismos de ação envolvidos na atividade do biocontrole para o desenvolvimento seguro dos processos de aplicação e como base para selecionar as cepas bacterianas mais eficientes (Paz et al., 2018; Nikolić et al., 2019).

A inibição de fitopatógenos por bactérias é geralmente realizada com pelo menos dois mecanismos antagônicos, o que a torna mais eficiente no controle de doenças em frutas pós-colheita (Safdarpour, Khodakaramian, 2018). É desejável em um antagonista que ele atue por meio de mais de um mecanismo de ação contra fitopatógenos, a fim de ampliar a eficácia do biocontrole.

Embora a maioria dos antagonistas testados tenha apresentado a produção de compostos voláteis como mecanismo de ação, os quatro isolados usados nos "mix" bacterianos possuem pelo menos dois mecanismos de ação, exceto o *Chryseobacterium* spp. que foi selecionado devido à sua alta inibição do patógeno "in vitro" pela produção de COVs. Vale ressaltar o isolado 794 (*Pseudomonas* spp.), que exibiu três mecanismos de ação distintos: produção de compostos difusíveis e voláteis, além de quitinase, e o isolado 898 (*Bacillus* spp.), que apresentou dois mecanismos, compostos voláteis e quitinase, além da

produção de biofilme, presente em todos os isolados testados. Esses isolados foram combinados para o controle biológico de *C. brevisporum*.

Na antibiose, a produção de compostos antibióticos é um dos mecanismos que tem sido classificado como importante após a competição por espaço e nutrientes. A antibiose foi verificada no estudo apenas no isolado 794 (*Pseudomonas geniculata*), sendo que este integrou todos os mix utilizados. Os principais antibióticos produzidos por bactérias antagonistas do gênero *Pseudomonas* spp. é a pirrolitrina (Torres et al., 2014).

A antibiose também pode ser realizada por meio da produção de compostos de baixo peso molecular por microrganismos, os COVs, que têm efeito direto no crescimento do fitopatógeno. São ativos em baixas concentrações e pertencem a vários grupos químicos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, lactonas, terpenos e compostos sulfurados. Devido à sua volatilidade, esses compostos podem percorrer grandes distâncias em ambientes estruturalmente heterogêneos, bem como em compostos sólidos, líquidos ou gasosos, o que é uma grande vantagem para o biocontrole. COVs receberam atenção limitada em comparação com outros mecanismos antagônicos. No entanto, pesquisas recentes têm focado nesses produtos voláteis do metabolismo (Fialho et al., 2011).

Layton et al. (2011) avaliaram o efeito antagônico do gênero *Bacillus* sp contra fungos fitopatogênicos como *Fusarium oxysporum* spp. Observou-se que a ação de biocontrole desse gênero bacteriano é mediada pelo seu perfil bioquímico, uma vez que são produtoras de múltiplos metabólitos biologicamente ativos, como Iturina A e fengycin em *Bacillus subtilis* e gramicidina S (1-5) em *Bacillus brevis*, que são capazes de inibir o desenvolvimento e crescimento normal de outros microrganismos, sugerindo seu uso no controle biológico de pragas.

Velázquez-Becerra et al. (2013) descobriram que *Arthrobacter agilis* UMCV2 produz COVs. Isso foi confirmado por meio da análise de cromatografia gasosa e espectrometria de massas, que identificou a dimetil hexadecilamina como o composto que inibiu *Botrytis cinerea* e *Phytophthora cinnamomi*, demonstrando uma atividade inibitória 12 vezes maior que a causada pelo fungicida Captan.

Raza et al. (2016) observaram que a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9 produz COVs capazes de inibir o crescimento de *Ralstonia solanacearum*. Embora a cepa SQR-9 tenha produzido 22 COVs, apenas nove exibiram atividade antibacteriana contra a doença. Em contraste, todos os isolados utilizados neste estudo para o biocontrole da antracnose em frutos de mamão foram capazes de produzir COVs com ação antimicrobiana contra *C. brevisporum*. A caracterização do perfil desses COVs pode ser uma ferramenta útil para identificar os compostos diretamente ligados ao biocontrole.

No biocontrole, ocorre parasitismo quando o antagonista se alimenta do fitopatógeno, resultando em lise parcial ou total de suas estruturas. Especificamente, as bactérias se alimentam das paredes celulares dos fungos, principalmente da quitina, glucanas e proteínas, que constituem 20%, 50-60% e 20-30% da parede celular, respectivamente (Spadaro, Droby, 2016).

A quitina é um homopolímero linear e insolúvel formado por subunidades de N-acetil glucosamina ligadas por β -1,4, e atua como suporte medular da parede celular e principal constituinte dos conídios (Seidl, 2008). O β -1,3-glucano é considerado o principal constituinte estrutural da parede celular, ao qual outros componentes da parede celular estão ligados covalentemente, proporcionando resistência mecânica e integridade. A decomposição da parede celular fúngica requer a participação de diferentes enzimas, principalmente β -1,3-glucanase, quitinase e protease (Safdarpour, Khodakaramian, 2019).

Os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são considerados alguns dos antagonistas mais eficientes no controle de fitopatógenos devido à ação direta da quitinase (Yu et al., 2008). Isso foi verificado no uso combinado dos "mix" 1 e 3, onde existia tanto *Pseudomonas* quanto *Bacillus* na mesma composição. Shivakumar et al. (2014) realizaram purificação parcial, caracterização e estudos cinéticos da enzima quitinase da bactéria *Bacillus subtilis* JN032305, em que a enzima parcialmente purificada não só apresentou atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

Já Mohammadi et al. (2017) realizaram um estudo sobre o potencial isolamento bacteriano (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium* e *Agrobacterium radiobacter*) para o biocontrole em frutas cítricas contra o mofo azul causado por *Penicillium digitatum*, no qual foram determinadas as

atividades enzimáticas extracelulares bacterianas, mostrando que todas as quitinases e glucanases foram positivas.

Este é o primeiro relato de *Chryseobacterium* spp. como agente de biocontrole em pós-colheita, na cultura do mamoeiro e em uso combinado. Dos testes realizados, este agente reduziu o crescimento micelial "in vitro" em 60% (dados não publicados), além de agregar-se em biofilme significativamente. Essa bactéria foi isolada pela primeira vez em folhas de chá verde por Kook et al. (2014) na Coreia.

Seu potencial de biocontrole já foi observado por Kumar et al. (2021), que verificaram excelente atividade antifúngica com mais de 80,0% de inibição do crescimento micelial de *Magnaporthe oryzae*, agente causal da bruzone do arroz, por meio da produção de compostos voláteis. Além disso, a análise química dos COVs emitidos por *Chryseobacterium* spp. indicou a abundância de 2-Etil-hexanol; 1-Hexadeceno; 2-hexil-decanol; Heptanal; Furan-diol; e Octanal.

Dibelli (2023) avaliou e caracterizou *Chryseobacterium camelliae* e mais 27 cepas bacterianas quanto ao potencial para promover crescimento em plantas. Os traços observados vão desde a produção de enzimas e metabólitos essenciais para o pleno desenvolvimento vegetal, produção de biofilme até a atuação como agentes de biocontrole de *Colletotrichum* spp. em cana-de-açúcar. A cepa foi avaliada quanto à produção de esterases, fixação de nitrogênio, produção de amônia, exibindo resultados significativos e biofilme com produção máxima quando comparada aos demais isolados avaliados.

Além dos compostos antimicrobianos, os agentes de biocontrole também apresentaram a capacidade de formação de biofilme. Essa é uma estratégia de crescimento bacteriano em superfícies. Os resultados obtidos quanto à produção e estabelecimento do biofilme estão em conformidade com as descobertas de Costerton et al. (1999), que investigaram que a formação de biofilmes maduros pode depender de uma combinação de fatores, como ajustes celulares e ciclos de crescimento influenciados pela difusão de nutrientes na comunidade.

Neste ensaio, também foram obtidos maiores valores de adesão celular no tempo de 48 horas de incubação, sugerindo que houve desagregação das células do biofilme com o esgotamento de nutrientes após 72 horas para todos os isolados. Diversos mecanismos favorecem a desagregação dos biofilmes, e como consequência, as células são dispersas em sentidos opostos, o que é

vantajoso, pois permite a colonização de outros nichos com condições mais favoráveis de crescimento (Flemming et al., 2016).

O estresse nutricional parece ser o principal sinal ambiental para a associação de procariotos unicelulares em associações multicelulares. Dessa forma, acredita-se que a formação de biofilmes seja uma resposta adaptativa à sobrevivência em condições adversas (Webb, Givskov, Kjelleberg, 2003).

O meio mínimo de sais (MMS) é um meio de cultura que contém apenas os nutrientes essenciais para o crescimento bacteriano. Embora seja um meio de cultivo limitado em nutrientes, estudos mostram que o MMS pode favorecer a produção de biofilme bacteriano. A presença dos cátions divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} pode ter elevado a formação de biofilme diretamente por meio das interações eletrostáticas e indiretamente por desempenhar funções celulares importantes como cofatores enzimáticos, por exemplo (Fletcher, 1988; Körstgens et al., 2001). Isso ocorre porque a escassez de nutrientes no MMS pode induzir as bactérias a se agruparem em comunidades para compartilhar recursos e sobreviver.

A desagregação do biofilme bacteriano após 48 horas no meio mínimo de sais pode ocorrer por vários motivos, como a falta de nutrientes para manter a adesão das células ou a ativação de interrupção do biofilme. Além disso, as bactérias podem se mover para outras áreas do meio de cultura em busca de nutrientes, provocando a desagregação do biofilme.

Para colonizar superfícies de frutas com sucesso, as bactérias antagonicas devem ter características específicas que facilitem sua adesão, colonização e multiplicação. Na maioria dos casos, essas características estão associadas à formação de biofilmes, nos quais as microcolônias estão dentro de uma matriz extracelular produzida por bactérias e ácidos nucleicos e exopolissacarídeos.

A formação dessa estrutura é medida por quorum sensing com reguladores, como tirosol, farnesol e álcool fenetílico. As microcolônias também se comunicam pelo mesmo mecanismo, empregando diversos sinais químicos para supervisionar seu ambiente, alterando a expressão gênica e angariando vantagem sobre seus competidores (Chi et al., 2015).

No biocontrole, os biofilmes formados atuam como barreiras que se posicionam entre a superfície da lesão do hospedeiro e o fitopatógeno. No

entanto, pouco se sabe sobre as principais funções e mecanismos envolvidos na formação de biofilmes. Tem sido sugerido que os sinais ambientais regulam as transformações morfogênicas e contribuem para seleção de bactérias de forma mais eficiente. Em ambientes agrícolas, é crescente o número de estudos sobre a formação de biofilmes (Beauregard et al., 2013; Chen et al., 2013).

O alicerce desses modelos é que o *Bacillus subtilis* funciona como uma comunidade cooperativa por diferenciação populacional de progenitores isogênicos especializados, bem como pela produção de macromoléculas que formam a matriz do biofilme (Lamakis et al., 2008; Ostrowsk et al., 2011).

Haggag e Timmusk (2008) demonstraram que a bactéria *Paeni bacillus polymyxa* coloniza as raízes das plantas, formando estruturas que se assemelham a biofilmes e protegendo as raízes contra doenças causadas por fitopatógenos. Outro exemplo é *Pseudomonas fluorescens* estirpe CHA0, que mostrou uma capacidade melhorada para colonizar raízes de cenoura (Bianciotto et al., 2001). Bais et al. mostrou que uma cepa de *B. subtilis* (ATCC6051) pode formar estruturas do tipo biofilme nas raízes de plantas de *Arabidopsis* e, assim, protegê-las da infecção pela bactéria *Pseudomonas syringae* (Bais, Fall, Vivanco, 2004).

De acordo com os resultados obtidos, a capacidade de formação do biofilme por antagonistas desempenha papel importante na prevenção de fitopatógenos na pós-colheita. Contudo, isoladamente, não é suficiente para garantir o sucesso do biocontrole. Há de considerar que as bactérias avaliadas produziam compostos antimicrobianos difusíveis e voláteis, além de quitinases. Ademais, é importante confirmar a importância individual de cada característica, correlacionando com a capacidade ou não de formação de biofilme para cada isolado (Chen et al., 2013).

Em um meio rico, como um fruto, o biofilme pode favorecer o biocontrole, pois pode atuar como um escudo protetor para fungos fitopatogênicos como *C. brevisporum*. No entanto, é importante notar que a desagregação do biofilme bacteriano não é necessariamente negativa para o biocontrole. Uma vez que se observou a retomada da maturação dos frutos após a remoção dos “mix” bacterianos, além de aumentar o tempo de prateleira.

A indução de resistência é a capacidade de uma bactéria antagonista provocar resposta de defesa no hospedeiro por meio de diversas reações

químicas ou bioquímicas, incluindo alterações na estrutura do tecido e produção de proteínas relacionadas à patogênese, expressas localmente ou sistemicamente (Bahadou et al., 2018). A indução de resistência em frutas por bactérias, como BCA, tem sido considerada um modo de ação para controlar doenças pós-colheita (Jamalizadeh et al., 2011; Hernandez-Montiel et al., 2018). A indução da resposta de defesa se dá pela superprodução de diferentes enzimas e metabólitos, notadamente (1) proteínas ligadas à patogenicidade (proteínas PR), que incluem glucanases, quitinases.

A resposta imune nos vegetais é mediada e dependente de fitoreguladores, como ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno (Hacquard et al., 2017; Guo et al., 2018). A indução de resistência no tecido hospedeiro correlaciona-se pelo tratamento bacteriano antagonista (Spadaro, Droby, 2016). Diante do estudo realizado, estabeleceu-se a evidência direta da capacidade das substâncias induzidas em inibir a infecção por *Colletotrichum brevisporum* em frutos de mamão na pós-colheita.

Utilizar agentes de biocontrole oriundos do ambiente nativo pode ser uma alternativa eficaz para o controle de doenças pós-colheita, pois esses antagonistas são uma excelente fonte de ocorrência natural e estão bem adaptados à superfície alvo (Alvindhia, Natsuaki, 2009; Janisiewicz, Conway, 2010).

Ao utilizar bactérias antagonistas produtoras de biofilme em conjunto com outros agentes de biocontrole, é possível aumentar a eficiência do controle de patógenos. Isso ocorre porque o biofilme produzido pelas bactérias confere uma camada protetora, permitindo que o agente de biocontrole atue diretamente contra o patógeno, sem competir com outras espécies bacterianas ou lidar com condições ambientais desfavoráveis. Essa abordagem também promove uma interação mais direta entre a bactéria antagonista e o patógeno, aumentando a eficácia do biocontrole da antracnose em frutos de mamão.

O resíduo dos agroquímicos no mamão, assim como em outras culturas de frutas, tem sido e continuará sendo uma das principais preocupações dos órgãos fiscalizadores e dos consumidores. A crescente preocupação com os riscos relacionados à saúde humana e à contaminação ambiental tem levado à demanda pelo desenvolvimento de alternativas para o controle de doenças pós-

colheita. O uso do controle biológico como outro método aos fungicidas sintéticos tem sido foco de pesquisa nos últimos 30 anos em todo o mundo.

Este trabalho forneceu resultados sobre os modos de ação de bactérias antagonistas, que são consideradas alternativas viáveis aos fungicidas sintéticos, bem como o sucesso em condições “*in vivo*” e “*in vitro*”, a fim de subsidiar a produção de produtos biológicos baseados em bactérias antagonistas para controle da antracnose em frutos de mamão na pós-colheita. Mais pesquisas devem ser desenvolvidas com relação ao modo de ação dos antagonistas para entender melhor as interações patógeno-antagonista-hospedeiro. Ademais, por meio do advento da biologia molecular foi possível identificar em nível de espécie os agentes de biocontrole. Contudo, identificar os compostos voláteis que foram prevalentes neste estudo poderá trazer mais informações a respeito do sucesso do biocontrole exibido neste estudo.

REFERÊNCIAS

- ALVINDIA, Dionisio G.; NATSUAKI, Keiko T. Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from the surface of banana fruits against crown rot pathogens of banana. **Crop protection**, v. 28, n. 3, p. 236-242, 2009.
- BAHADOU, Smail Ait et al. New potential bacterial antagonists for the biological control of fire blight disease (*Erwinia amylovora*) in Morocco. *Microbial pathogenesis*, v. 117, p. 7-15, 2018.
- BAIS, HarshPal; FALL, Ray; VIVANCO, Jorge M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Arabidopsis root infection by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology*, v. 134, n. 1, p. 307-319, 2004.
- BEAUREGARD, Pascale B. et al. Induction of biofilm by plant polysaccharides in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 17, p. E1621-E1630, 2013.
- BIANCIOTTO, Valeria; BONFANTE, Paola. Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 365-371, 2002.
- CALVO, H. et al. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. **Food microbiology**, v. 63, p. 101-110, 2017.
- CHEN, Yun et al. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. **Environmental microbiology**, v. 15, n. 3, p. 848-864, 2013.
- CHI, Mengshan et al. Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. **Biological Control**, v. 90, p. 113-119, 2015.
- CORTAGA, Cris Q. et al. Mutations associated with fungicide resistance in *Colletotrichum* species: **A Review. Phytoparasitica**, p. 1-24, 2023.
- COSTERTON, J. William. Introduction to biofilm. **International journal of antimicrobial agents**, v. 11, n. 3-4, p. 217-239, 1999.
- DIBELLI, Sabrina Custodio. Evidenciação de múltiplos traços de promoção de crescimento vegetal em isolados de comunidades bacterianas associadas a cana-de-açúcar. 2023.
- FERNANDES, Maria do Carmo de A.; SANTOS, Amaury S.; RIBEIRO, Raul De Lucena D. Adaptação patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de frutos de jiloeiro, pimentão e berinjela. **Summa phytopatológica**, v. 28, n. 4, p. 325-330, 2002.

- FIALHO, Maurício Batista *et al.* Potential of antimicrobial volatile organic compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in beanseeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 137-142, 2011.
- FLEMMING, Hans-Curt *et al.* Biofilmes: uma forma emergente de vida bacteriana. **Nature Reviews Microbiology** , v. 14, n. 9, pág. 563-575, 2016.
- FLETCHER, MADILYN. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 5, p. 2027-2030, 1988.
- FU, Gang *et al.* Characterization of a bacterial biocontrol strain B106 and its efficacies on controlling banana leaf spot and post-harvest anthracnose diseases. **Biological Control**, v. 55, n. 1, p. 1-10, 2010.
- GUO, Hongqing *et al.* FERONIA receptor kinase contributes to plant immunity by suppressing jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. **Current Biology**, v. 28, n. 20, p. 3316-3324. e6, 2018.
- HACQUARD, Stéphane *et al.* Interplay between innate immunity and the plant microbiota. **Annual review of Phytopathology**, v. 55, p. 565-589, 2017.
- HAGGAG, W. M.; TIMMUSK, S. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 4, p. 961-969, 2008.
- HERNANDEZ-MONTIEL, Luis G. *et al.* Mecanismos empregados por *Debaryomyces hansenii* no controle biológico da antracnose em frutos de mamão. **Biologia e Tecnologia Pós-Colheita** , v. 139, p. 31-37, 2018.
- JAMALIZADEH, M. *et al.* A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. **Eppo Bulletin**, v. 41, n. 1, p. 65-71, 2011.
- JANISIEWICZ, Wojciech J.; CONWAY, William S. Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decay after harvest. 2010.
- KOOK, MooChang *et al.* *Chryseobacterium camelliae* sp. nov., isolated from green tea. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. Pt_3, p. 851-857, 2014.
- KÖRSTGENS, V. *et al.* Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. **Water science and technology**, v. 43, n. 6, p. 49-57, 2001.
- LAYTON, Cristian *et al.* *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. **Nova**, v. 9, n. 16, 2011.

- LAMARI, L. Asses 2.0: Software de Análise de Imagens para Quantificação de Doenças de Plantas; American Phytopathological Society: St. Paul, MN, EUA , 2002.
- MOHAMMADI, Parisa et al. Potencial de algumas bactérias para o controle biológico do mofo verde pós-colheita de citros causado por *Penicillium digitatum*. **Plant Protection Science**, v. 53, n. 3, p. 134-143, 2017.
- NIKOLIĆ, Ivan et al. Controle biológico de *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* em beterraba sacarina com as cepas *Bacillus pumilus* SS-10.7 e *Bacillus amyloliquefaciens* (SS-12.6 e SS-38.4). **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 1, p. 165-176, 2019.
- OSTROWSKI, Adam et al. A função de YuaB em sinergia com o exopolissacarídeo e as fibras amiloides TasA permite a formação de biofilme por *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 18, p. 4821-4831, 2011.
- PANEBIANCO, Salvina et al. Controle aprimorado da deterioração de frutas cítricas pós-colheita por meio do uso combinado de agentes de controle biológico compatíveis. **Biological Control**, v. 84, p. 19-27, 2015.
- PAZ, Isabel Cristina Padula et al. Controle biológico de *Botrytis cinerea* e *Calonectria gracilis* por meio de promotores de crescimento de eucalipto *Bacillus* spp. **Microbial pathogenesis**, v. 121, p. 106-109, 2018.
- PUJER, Parvati et al. Manejo da Antracnose Pós-Colheita do Mamão (*Carica papaya*) Utilizando Microrganismos Antagonistas. **Revista Internacional de Meio Ambiente e Mudanças Climáticas**, v. 12, n. 11, pág. 2662-2673, 2022. See More.
- RAZA, Waseem et al. Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.
- ROMEIRO, R.S. Métodos em Bacteriologia de Plantas. Viçosa: UFV, 279p, 2001.
- SAFDARPOUR, Fahime; KHODAKARAMIAN, Gholam. Assessment of antagonistic and plant growth promoting activities of tomato endophytic bacteria in challenging with *Verticillium dahliae* under in-vitro and in-vivo conditions. **Biological Journal of Microorganism**, v. 7, n. 28, p. 77-90, 2018.
- SEIDL, Verena. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 36-42, 2008.
- SHIVAKUMAR, Srividya; KARMALI, Anika Nayak; RUHIMBANA, Charles. Partial purification, characterization, and kinetic studies of a low-molecular-weight, alkali-tolerant chitinase enzyme from *Bacillus subtilis* JN032305, a potential biocontrol strain. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 617-632, 2014.

SPADARO, Davide; DROBY, Samir. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Science & Technology**, v. 47, p. 39-49, 2016.

TALHINHAS, Pedro; BARONCELLI, Riccardo. Colletotrichum species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. **Fungal Diversity**, v. 110, n. 1, p. 109-198, 2021.

TEIXEIRA, Bárbara et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial crops and products**, v. 43, p. 587-595, 2013.

THOKCHOM, Elizabeth et al. Root colonization by host-specific rhizobacteria alters indigenous root endophyte and rhizosphere soil bacterial communities and promotes the growth of mandarin orange. **European Journal of Soil Biology**, v. 79, p. 48-56, 2017.

TORRES, R. et al. Optimization of packaging and storage conditions of a freeze-dried *Pantoea agglomerans* formulation for controlling postharvest diseases in fruit. **Journal of applied microbiology**, v. 117, n. 1, p. 173-184, 2014.

VELÁZQUEZ-BECERRA, Crisanto et al. The *rhizobacterium* *Arthrobacter agilis* produces dimethyl hexadecyl lamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi in vitro. **Protoplasma**, v. 250, p. 1251-1262, 2013.

VILAPLANA, Rosa et al. Combination of hot water treatment and chitosan coating to control anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) during the postharvest period. **Crop Protection**, v. 128, p. 105007, 2020.

VLAMAKIS, Hera et al. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. **Genes & development**, v. 22, n. 7, p. 945-953, 2008.

WEBB, Jeremy S.; GIVSKOV, Michael; KJELLEBERG, Staffan. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 6, p. 578-585, 2003.

YU, Ting et al. Effect of chitin on the antagonistic activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* in pear fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, n. 1-2, p. 44-48, 2008.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS ORGÂNICOS EM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS FORMADORAS DE BIOFILME

IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS ORGÂNICOS EM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS FORMADORAS DE BIOFILME

RESUMO GERAL

O presente estudo teve como objetivo investigar os compostos orgânicos voláteis (Covs) produzidos por bactérias endofíticas em resposta à presença e ausência do fungo fitopatogênico *C. brevisporum*, buscando o controle biológico da antracnose em frutos de mamão. Foram avaliadas doze bactérias previamente selecionadas por sua atividade antimicrobiana, das quais apenas quatro foram escolhidas: (768) *Enterobacter* spp., (794) *Pseudomonas* spp., (898) *Bacillus* spp. e (929) *Chryseobacterium* spp. A análise dos Covs produzidos por essas bactérias revelou uma maior diversidade na presença do fungo, com destaque para cetonas, álcoois e ésteres. É relevante destacar os resultados obtidos pelo *Bacillus* spp., não apenas por pertencer ao gênero amplamente reconhecido no biocontrole de doenças, mas também por seu comportamento peculiar. Na ausência do fungo, esse isolado produziu alguns compostos comuns aos outros isolados analisados, exceto pelo óxido de etileno. Além disso, a presença do fungo influenciou a produção específica de Covs pelas bactérias. Observou-se que a presença do fungo pode ter um impacto significativo na produção de COVs pelas bactérias, variando conforme a espécie bacteriana em questão. O *Bacillus* spp., quando exposto ao fungo, apresentou alterações na composição de seus compostos, com redução significativa em sua quantidade e mudanças em sua composição. O estudo ofereceu insights valiosos sobre o potencial dos Covs no controle da antracnose em frutos de mamão, destacando a importância do manejo integrado para o controle da antracnose. O conhecimento dessas interações pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes e sustentáveis no combate da doença.

Palavras-chave: Compostos Antimicrobianos, Controle Biológico, Covs, Quorum sensing, Papaya.

IDENTIFICATION OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN BIOFILM-FORMING ENDOPHYTIC BACTERIA

GENERAL ABSTRACT

The present study aimed to investigate the volatile organic compounds (VOCs) produced by endophytic bacteria in response to the presence and absence of the phytopathogenic fungus *C. brevisporum*, seeking the biological control of anthracnose in papaya fruits. Twelve bacteria previously selected for their antimicrobial activity were evaluated, of which only four were chosen: (768) *Enterobacter* spp., (794) *Pseudomonas* spp., (898) *Bacillus* spp., and (929) *Chryseobacterium* spp. A total of 80 distinct compounds were produced by the bacteria considering the presence and absence of the fungus. A greater diversity of compounds was observed in the presence of the fungus, especially ketones in *Pseudomonas* spp. and *Enterobacter* spp. Additionally, other prominent classes in the study included alcohols and esters produced by all evaluated species. The analysis of VOCs produced by these bacteria revealed a greater diversity in the presence of the fungus, highlighting ketones, alcohols, and esters. *Enterobacter* spp., *Bacillus* spp., and *Pseudomonas* spp. produced a higher quantity of volatile compounds in the absence of the fungus compared to its presence, indicating a reduction in compound production in the presence of the fungus. In contrast, *Chryseobacterium* spp. showed the opposite pattern. It is relevant to highlight the results obtained by *Bacillus* spp., which, when exposed to the fungus, underwent changes in the composition of its compounds and significantly reduced the quantity of produced compounds. The study provided valuable insights into the potential of VOCs in the control of anthracnose in papaya fruits.

Keywords: Antimicrobial compounds, Biological Control; Vocs, Quorum sensing, Papaya

1.0 INTRODUÇÃO

O mamão é uma fruta climatérica altamente nutritiva e com valor medicinal, produzida em diferentes regiões do Brasil, destacando-se os estados da Bahia, Espírito Santo e Ceará como os maiores produtores. Entretanto, o rápido amadurecimento da fruta a torna altamente suscetível a doenças pós-colheita, como a antracnose causada por *Colletotrichum* spp., que é responsável por perdas expressivas e que geram prejuízos significativos à cadeia produtora (Vilaplana et al., 2022).

Para o controle efetivo da antracnose, é importante considerar a resistência dos patógenos aos métodos convencionais e os impactos ambientais associados a eles. Além disso, o uso de fungicidas pode ser limitado em função da seleção de populações de patógenos resistentes. Nesse sentido, o controle biológico surge como um método promissor, envolvendo o uso de agentes como bactérias para controlar a doença. O emprego de agentes de biocontrole para combater fitopatógenos tem atraído mais atenção recentemente, já que oferecem um método eficaz e seguro de contornar as desvantagens dos fungicidas convencionais (Chechi et al., 2019; Hu et al., 2015).

As bactérias apresentam diversos mecanismos antagônicos contra fungos fitopatogênicos, notadamente antibiose e síntese de compostos voláteis, enzimas hidrolíticas, indução de resistência e formação de biofilmes (Safdarpour, Khodakaramian, 2018; Dukare et al., 2019).

Os compostos orgânicos voláteis microbianos (COVs) podem ser produzidos por microrganismos, especialmente bactérias durante o seu metabolismo (Giorgio et al., 2015; ZHENG et al., 2019). Entre os microrganismos, *Bacillus subtilis* continua sendo o microrganismo mais estudado quanto a caracterização de COVs (Rajer et al., 2017).

Muitas investigações foram realizadas com bactérias potenciais agentes de controle biológico de algumas doenças fúngicas. Calvo et al. (2017) avaliaram o potencial de biocontrole de *Bacillus amyloliquefaciens* contra as principais doenças pós-colheita de laranja, maçã, uva. Já Damasceno et al., 2019 avaliaram o biocontrole da antracnose pós-colheita em banana por *B. velezensis* e *P. fluorescens*, e verificaram o controle efetivo da doença. De acordo com Kumar et al. (2021), uma excelente atividade antifúngica contra o agente causal

do brusone do arroz, Magnaportheorizae, com mais de 80,0% de inibição do crescimento micelial foi observada pela produção de compostos voláteis por *Chryseobacterium* spp.

Outros microrganismos incluem *B.amyloliquefaciens* Cappellari, Banchio,2020) *Pseudomonas fluorescens* (Wang et al.,2021), *Pseudomonas putida* (Giorgia et al.,2015; Aghisha et al.,2019), *Pseudomonas donghuensis* (Ossowick, Jafra, Garbeva,2017), dentre outros.

Com base na importância econômica do mamão na fruticultura brasileira e na severidade dos danos causados pela antracnose em frutos pós-colheita, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar e identificar os compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos pelas bactérias na ausência e presença de *C. brevisporum*, avaliar os COVs produzidos por bactérias endofíticas com potencial de biocontrole, e relacioná-los com a atividade antifúngica contra *C. brevisporum*.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção das bactérias

Foram utilizadas 12 bactérias previamente testadas quanto a produção de compostos antimicrobianos voláteis, quitinase, inibição da germinação de conídios, crescimento a 37°C, biofilme e eficazes no uso combinado no biocontrole da antracnose em frutos do mamão causada por *C. brevisporum* (Tabela 1).

Tabela 1: Mecanismos de ação de bactérias endofíticas formadoras de biofilme no biocontrole da antracnose causado por *Colletotrichum brevisporum*.

ISOLADOS	% INIBIÇÃO POR CV	OUTROS MECANISMOS	BIOFILME
642	59,19	**	+
643	42,73	**	+
755	64,16	**	+
768	70,76	IC	+
794	32,81	CD, Q	+
853	75,45	IC	+
892	27,98	**	+

898	46,85	Q	+
912	69,83	Q	+
925	56,12	**	+
928	53,28	**	+
929	59,94	**	+

CV- Compostos voláteis; IC-inibição da germinação de conídios; Q- quitinase

Todas as bactérias (Tabela 1) foram avaliados para verificar sua capacidade de formação de biofilme em placas de ELISA ou microtitulação contendo meio MMS. Os isolados foram cultivados em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) por aproximadamente 18 horas a 26 °C. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas em solução salina esterilizada. A densidade ótica das células foi ajustada para obter uma população equivalente a 1×10^8 UFC mL⁻¹.

As células foram adicionadas a placas de microtitulação contendo meio MMS e incubadas a 26 °C por 24, 48 e 72 horas. Após a incubação, as células não aderidas foram removidas e as células aderidas foram coradas com cristal violeta. As placas foram lavadas e as leituras das densidades óticas foram feitas a 600 nm.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições por isolado. As leituras das densidades óticas relacionaram-se à aderência das células bacterianas à placa de microtitulação e sua capacidade de formação de biofilme.

2.2 Produção de compostos antimicrobianos voláteis

Empregou-se o método das placas sobrepostas conforme BHARAT *et al.* (1980). Para isso, 100 µL de cada suspensão bacteriana foram semeados e espalhados sobre o meio NA (Nutriente ágar) em placa de Petri, de forma a produzir uma camada de células na superfície do meio. Após o crescimento das bactérias por 24 h a 28 °C, foi depositado um disco do micélio do patógeno com 5 mm de diâmetro sobre meio BDA no fundo de outra placa. As tampas foram removidas e as duas placas uma contendo disco de micélio do fungo e a outra a

suspensão bacteriana unidas, seladas com filme de PVC e mantidas a 28 °C, por 10 dias, até que o micélio do tratamento controle contendo apenas o fungo em BDA, atingisse o crescimento máximo em toda placa. Todas as placas foram fotografadas, e o crescimento micelial radial do patógeno foi mensurado com o software Assess 2.0 (Image analysis software for plant disease quantification) (LAMARI,2002). Placas contendo apenas o fungo *Colletotrichum* spp. foram utilizadas como controle. Foram selecionados os isolados bacterianos que inibiram o crescimento do fungo acima de 50 %, em comparação ao controle. O experimento foi conduzido em triplicata, cujas médias da inibição foram utilizadas para selecionar os isolados.

2.3 Análise por HS-SPME por GC-MS para determinação de compostos orgânicos voláteis em amostras de isolados bacterianos.

A análise de compostos voláteis em amostras de isolados bacterianos na presença e na ausência do fungo em meio sólido, foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector por espectrometria de massas (GC-MS 7890A/5975C Agilent Technologies). Para separação cromatográfica dos compostos, utilizou-se uma coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm d.i x 0,25 µm, Agilent J&W). Gás hélio ultrapuro foi utilizado como gás de arraste a 0,8 mL.min⁻¹. As condições cromatográficas foram otimizadas durante o estudo, sendo a temperatura do injetor mantida a 250 °C, a temperatura da fonte de íons a 230 °C e a energia de 70 eV. A temperatura inicial da coluna de 45 °C mantida por 5 minutos, em seguida aumentada a 4 °C.min⁻¹, até 230 °C a qual foi mantida por mais 10 minutos. O processo de extração HS-SPME (microextração em fase sólida no headspace) foi realizado utilizando fibra de extração DVB/CAR/PDMS (50/30µm, Supelco) acoplado ao sistema de autoinjeção. Cerca de 5 g de amostra de isolados em meio sólido (NA) foram transferidos para um vial do tipo headspace de 20 mL. Adicionou-se 5 mL de solução saturada de cloreto de potássio e os vials tampados. A extração foi realizada a 40 °C, sob agitação de 500 rpm por 30 minutos com a fibra exposta no headspace. A dessorção térmica dos compostos foi realizada diretamente no injetor, por 10 minutos. A identificação dos compostos foi realizada por

comparação dos espectros de massas obtidos com o banco de dados do programa NIST Mass Spectral Search versão 2.0, 2011.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados um total de 12 isolados bacterianos quanto à produção de compostos voláteis. Entretanto, após o screening inicial, apenas quatro isolados foram selecionados, levando em conta também outros critérios como a produção de quitinase, inibição da germinação de conídios (Tabela 1) e a capacidade de formação de biofilme.

Para avaliar a produção de biofilme pelas bactérias selecionadas, foram conduzidos ensaios em placas de microtitulação contendo meio MMS. A incubação foi realizada por 24, 48 e 72 horas, sendo observada uma possível desagregação do biofilme após 48 horas. No entanto, para entender melhor a relação dos compostos voláteis com a agregação bacteriana em biofilme, é importante considerar outros elementos relacionados aos COVs.

Os metabólitos secundários têm sido amplamente estudados devido ao seu papel nas interações microbianas, sendo os COVs de particular interesse. Apesar de serem produzidos por microrganismos presentes no solo e nas plantas, os COVs ainda são pouco explorados e compreendidos em sua totalidade.

Estudos anteriores revelaram o efeito antifúngico dos COVs produzidos por isolados de *Pseudomonas* contra o fungo *S. sclerotiorum*, destacando seu potencial para o controle biológico (Fernando et al., 2005). *Bacillus* sp. também demonstrou redução significativa no peso e no número de escleródios de *S. sclerotiorum*, evidenciando sua eficácia como agente de biocontrole (Massawe et al., 2018). Além disso, estudos com COVs como 2-undecanone, 2-tridecanone e heptadecane de *B. amyloliquefaciens* demonstraram atividades de controle biológico, inibindo a motilidade, formação de biofilme e colonização de raízes pelo patógeno *Ralstonia solanacearum* (RAZA et al., 2016abc).

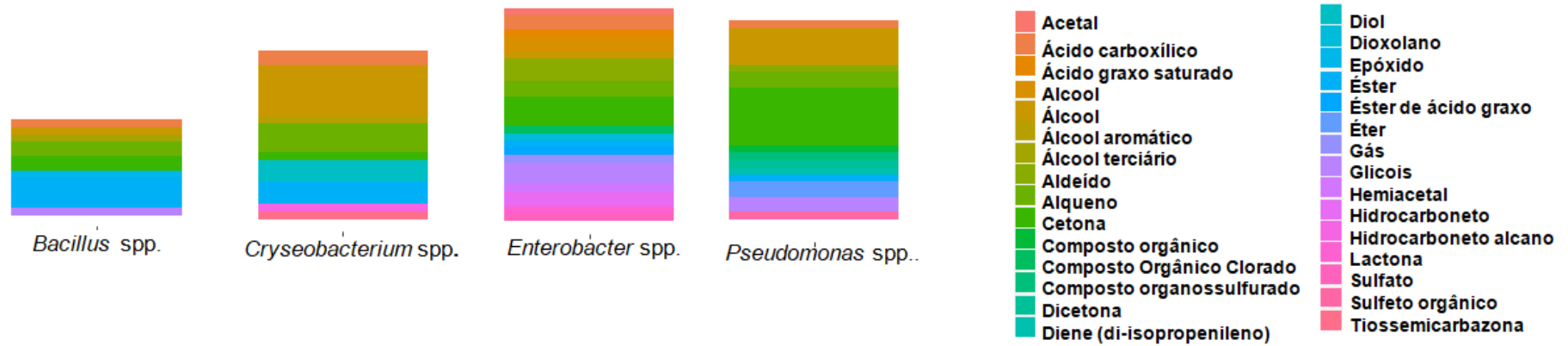
Os COVs têm diversas funções, incluindo a regulação das interações entre microrganismos e plantas por meio de moléculas de sinalização, que são responsáveis por regular processos fisiológicos essenciais. Essas moléculas

abrangem uma variedade de classes químicas, como cetonas, álcoois, pirazinas, alcenos, sulfetos, benzenóides, terpenos, entre outros (Goudjal et al., 2014; Chenniappan et al., 2018).

Os quatro isolados bacterianos utilizados nesta etapa foram identificados como (768) *Enterobacter* spp., (794) *Pseudomonas* spp., (898) *Bacillus* spp. e (929) *Chryseobacterium* spp. Pertencentes a coleção do Laboratório de Microbiologia do solo Embrapa Mandioca e Fruticultura, prospectados das folhas, cascas, polpas e sementes do mamão por Santos et al., (2021). Esses isolados apresentaram uma redução micelial in vitro superior a 70% do *C. brevisporum*, por meio da produção de compostos difusíveis, voláteis, inibição da germinação de conídios do patógeno. Além disso, foi avaliada a produção de compostos voláteis pelas bactérias na presença e na ausência do fungo. Como esperado, a presença do fungo influenciou na produção de compostos voláteis pelas bactérias, resultando em compostos distintos produzidos na presença do fungo (Tabela 2).

No total, foram produzidos 80 compostos distintos considerando a presença e a ausência do fungo pelas bactérias avaliadas. Observou-se uma maior diversidade de compostos na presença do fungo, especialmente cetonas em *Pseudomonas* spp. e *Enterobacter* spp. Além disso, outras classes marcantes no estudo incluíram álcoois e ésteres produzidos por todas as espécies avaliadas. Na ausência do patógeno, houve uma maior diversificação das classes de compostos produzidos pelas bactérias (Figura 1)."

Figura 1: Variação de classes químicas dos compostos voláteis produzidos pelas bactérias endofíticas antagonistas a *Colletotrichum brevisporum* na ausência/presença do fungo identificados pelo método HS-SPME por GC-MS, após 10 dias de cultivo em meio NA.



A representatividade das classes álcool e éster entre os compostos voláteis na presença de um fungo fitopatogênico pode ser atribuída às suas propriedades antimicrobianas e capacidade de interferir nas interações patógeno-antagonista. Os álcoois são conhecidos por atuarem como inibidores do crescimento de fungos patogênicos, além de possuírem atividade antimicrobiana contra diferentes patógenos, assim como os ésteres. Por sua vez, os ésteres podem interferir nos processos fisiológicos dos fungos patogênicos, afetando sua viabilidade e crescimento (Kaddes et al., 2019).

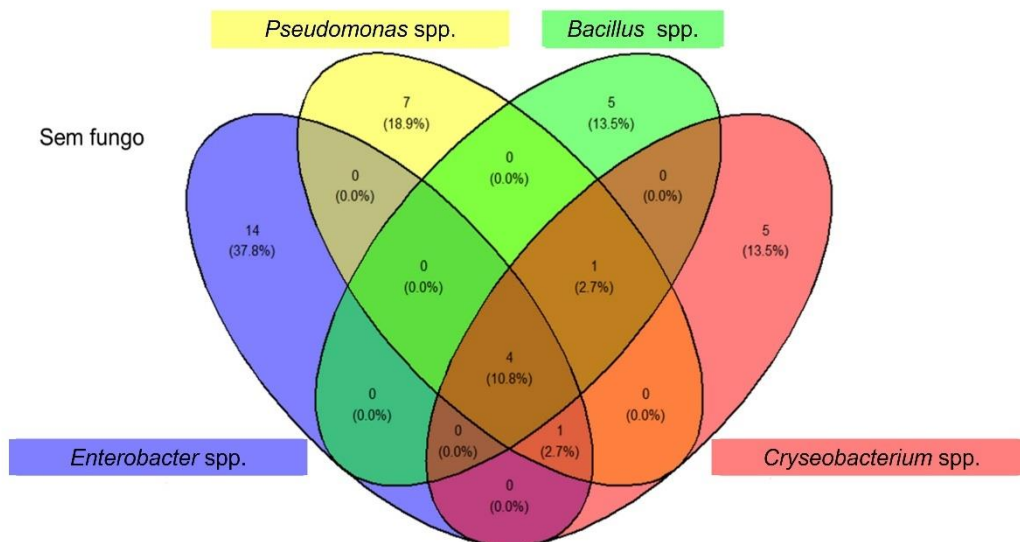
No caso específico do *Bacillus* spp., foi observada uma redução significativa na produção de COVs na presença do fungo, quando comparada com a ausência do fungo. Isso sugere uma possível produção de compostos mais específicos pelas bactérias na presença do patógeno (Figura 2).

Figura 2: Quantidade de compostos voláteis produzidos pelas bactérias endofíticas antagonistas a *Colletotrichum brevisporum* na ausência/presença do fungo identificados pelo método HS-SPME por GC-MS, após 10 dias de cultivo em meio NA.



Enterobacter spp., *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. produziram uma quantidade maior de compostos voláteis na ausência do fungo quando comparada a presença do fungo, o que indica uma redução na produção de compostos na presença do fungo. Já na *Cryseobacterium* spp. foi o inverso (Figura 3).

Figura 3:Diagrama de Venn com o total de compostos orgânicos voláteis produzidos pelas bactérias endofíticas avaliadas na ausência do fungo identificados pelo método HS-SPME por GC-MS, após 10 dias de cultivo em meio NA.



Dos 38 compostos voláteis produzidos pelas bactérias na presença do fungo, aproximadamente 26% (dez compostos) pertenciam à classe cetona. Essas cetonas têm sido amplamente estudadas devido ao seu potencial antifúngico e capacidade de controle sobre fungos patogênicos (Lima et al., 2018).

Estudos indicam que as cetonas exercem um papel importante no combate aos fungos patogênicos. Pesquisas conduzidas por Sigh et al. (2019) demonstraram que essas substâncias podem afetar o crescimento e desenvolvimento dos fungos, inibindo sua germinação e crescimento micelial. Além disso, algumas cetonas apresentaram atividade antifúngica direta, resultando na redução da viabilidade e sobrevivência dos patógenos (Lima et al., 2018).

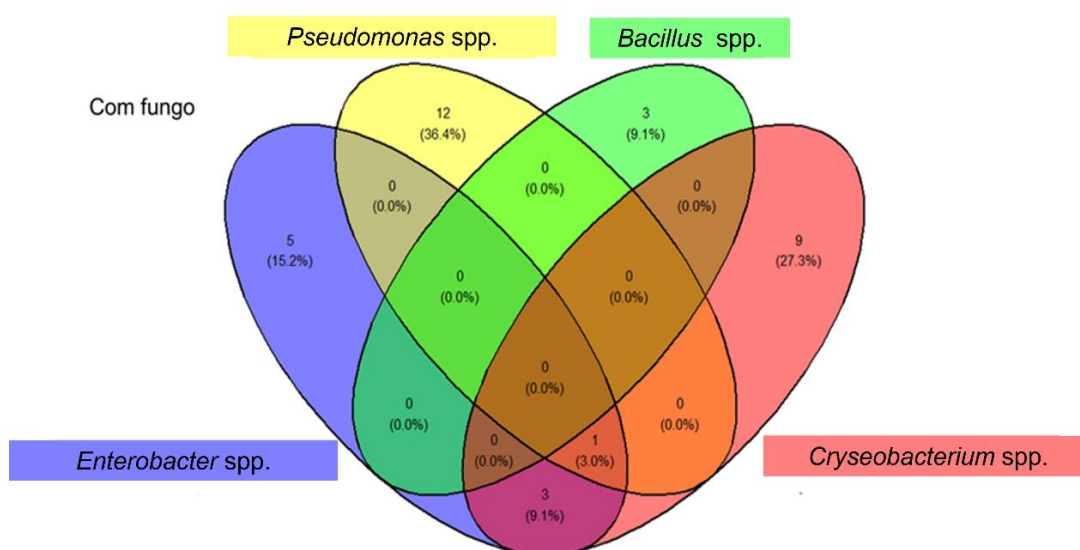
A ação antifúngica das cetonas pode ocorrer por meio de diferentes mecanismos. Elas podem interferir nas vias metabólicas dos fungos, afetando a síntese de proteínas e lipídios essenciais para o crescimento dos mesmos. Além disso, as cetonas podem afetar a integridade da membrana celular dos fungos (Lima et al., 2018; Sigh et al., 2019).

Notavelmente, foram identificados cinco compostos idênticos produzidos pelas bactérias na ausência do fungo, sendo eles: etanol, acetato de etila, ácido acético, acetil metil carbinol e butane 2-3-diol. A presença desses compostos pode estar relacionada às condições específicas do meio de cultura, favorecendo sua produção pelas bactérias estudadas. Além disso, as características metabólicas próprias das bactérias podem influenciar na síntese dessas substâncias.

Na presença do fungo, todas as bactérias, exceto *Bacillus* spp., produziram acetil metil carbinol. A bactéria *Enterobacter* spp. foi a única a produzir acetato de etila. Além disso, tanto *Enterobacter* spp quanto *Cryseobacterium* spp. produziram álcool isoamílico e butane-2-3-diol, assim como na ausência do fungo. O COV 2,3 butanodiol, já relatado por Ryu et al. (2004), foi produzido por *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* no controle de *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*.

Essas diferenças na produção de compostos voláteis pelas bactérias podem estar relacionadas a interações específicas entre as bactérias, o fungo e o ambiente de cultivo. A presença do fungo pode desencadear respostas metabólicas nas bactérias, resultando na produção desses compostos (Figura 4).

Figura 4: Diagrama de Venn com o total de orgânicos voláteis produzidos pelas bactérias endofíticas avaliadas na presença do fungo identificados pelo método HS-SPME por GC-MS, após 10 dias de cultivo em meio NA.



Um crescente corpo de evidências aponta que os compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos pelas bactérias podem ser uma alternativa ao uso de produtos químicos para proteger as plantas de patógenos, proporcionando um ambiente mais saudável para as culturas e o meio ambiente (Kanchiswamy, Malnoy, Maffei, 2015).

Neste estudo, foi observado que a presença do fungo pode ter um impacto significativo na produção de COVs pelas bactérias, variando conforme a espécie bacteriana em questão. Algumas bactérias apresentaram redução na produção de COVs na presença do fungo, enquanto outras não foram afetadas.

O composto acetil metil carbinol foi detectado em todas as bactérias avaliadas, independentemente da presença do fungo, exceto no *Bacillus* spp., que não o produziu na presença do fungo. O acetil metil carbinol é uma substância volátil comumente usada em produtos alimentícios para intensificar sabor e aroma. Acredita-se que sua produção esteja relacionada à fermentação alcoólica realizada pelas bactérias na conversão do NA em glicose, com presença significativa de etanol.

Estudos anteriores já demonstraram a eficácia do acetil metil carbinol no controle de patógenos fúngicos, como *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, *Monilinia laxa* e *Monilinia fructicola*, além de sua capacidade de induzir resistência sistêmica em plantas (D'alexandro et al., 2014; Gotor-Vila et al., 2017; Asari et al., 2016; Rudrapra et al., 2010).

Embora os compostos produzidos pelo fungo não tenham sido analisados neste estudo específico, os COVs desempenham um papel relevante na regulação do ambiente microbiano e na comunicação entre microrganismos por meio de vias de sinalização inter e intracelular (Chandrasekaran; Paramasivan; Sahayarayan, 2022). Quando em contato com o fungo, o *Bacillus* spp. pode produzir compostos específicos através de mecanismos de competição para garantir sua própria sobrevivência e, conseqüentemente, inibir o crescimento do fungo.

Destaca-se a relevância dos resultados obtidos pelo *Bacillus* spp. não apenas por pertencer ao gênero amplamente relatado no biocontrole de doenças, mas também por seu comportamento peculiar. Na ausência do fungo, esse isolado produziu alguns compostos comuns aos outros isolados analisados,

exceto pelo óxido de etileno. Esse gás, quando aplicado em frutas, estimula a produção natural de etileno, acelerando o processo de maturação e induzindo rotas sinalizadoras para a resistência induzida em plantas. No entanto, na presença do fungo, esse composto não foi produzido.

Além disso, quando exposto ao fungo, o *Bacillus* spp. apresentou alterações na composição de seus compostos, com redução significativa em sua quantidade e mudanças em sua composição (Tabela 2).

Tabela 2: Compostos voláteis produzidos pelas bactérias endofíticas antagonistas a *Colletotrichum brevisporum* na ausência/presença do fungo identificados pelo método HS-SPME por GC-MS, após 10 dias de cultivo em meio NA.

Id bactéria	Composto produzido na ausência do fungo	Classe	Composto produzido na presença do fungo	Classe
<i>E. homeachei</i>	Etanol	Álcool	Dicloroisocianurato de sódio	Composto Orgânico Clorado
	Hexanal	Aldeído	Álcool isoamílico	Álcool
	Butiraldeído	Aldeído	Pivalolactona	Lactona
	Ácido 5-terc-butoxitiofeno-2-carboxílico	Ácido carboxílico	Acetaldeído 2,3-butano diol acetal	Acetal
	Acetato de etila	Éster	5-Isopropil-2-metilbicyclo[3.1.0]hex-2-eno	Hidrocarboneto
	Ácido acético	Ácido carboxílico	Alfa-felandreno	Hidrocarboneto
	Acetil metil carbinol	Álcool terciário	Acetil metil carbinol	Álcool terciário
	Álcool isoamílico	Álcool	Butane-2,3-diol	Glicóis
	1-Octene	Alqueno	1,3-Butanodiol	Glicóis
	Acetaldeído 2,3-butano diol acetal	Hemiacetal		
	4-etil-1,3-dioxolano	Dioxolano		
	Butane-2,3-diol	Glicóis		

	Dodecil sulfato de sódio	Sulfato		
	Ácido palmítico	Ácido graxo saturado		
	Glicerol 1-palmitato	Éster de ácido graxo		
<i>P. geniculata</i>	Etanol	Álcool	Dióxido de carbono	Dióxido de carbono
	2-Pentanol	Éter	Propeno-1,1-d2	Propeno-1,1-d2
	Acetato de etila	Álcool	Acetaldeído	Acetaldeído
	Ácido acético	Éster	Metil Isopropil Cetona	Metil Isopropil Cetona
	Acetil metil carbinol	Álcool terciário	Diacetil	Diacetil
	Álcool isoamílico	Éter	Acetil metil carbinol	Álcool terciário
	Hept-1-eno	Cetona	Dissulfeto de dimetil	Dissulfeto de dimetil
	2,2-Dimethylcyclobutanone	Álcool	2-Nonanona	Cetona
	1-Hexanol	Alqueno	2-Heptanona	Cetona
	dissulfeto de dimetil	Cetona	2-Undecanona	Cetona
	Butane-2,3-diol	Álcool	2-pentadecanona	Cetona
	1,3-Butanediol	Composto organossulfurado	2-Dodecanona	Cetona
	(2R,3R)-(-)-2,3-butanodiol	Glicóis	Isopreno	Isopreno
	Álcool etílico	Glicóis		

<i>B. abus</i>	Etanol	Álcool	Penta-1,2-dieno	Alqueno
	2-butanona	Cetona	Trans-1,3-Pentadiene	Alqueno
	Acetato de etila	Éster	3-Methyl-2-pentanone	Cetona
	Ácido acético	Ácido carboxílico		
	Acetil metil carbinol	Álcool terciário		
	Isobutirato de etila	Éster		
	Butane-2,3-diol	Glicóis		
	Óxido de etileno	Epóxido		
	Etil 3-hidroxiacetato	Éster		
	Etil 2,6-dicloro-5-fluoro-piridina-3-acetoacetato	Éster		
<i>C. camelliae</i>	Etanol	Álcool	Acetato de etila	Éster
	Acetato de vinil	Éster	Pentano	Hidrocarboneto alcano
	Acetato de etila	Éster	Isobutanol	Álcool
	Ácido acético	Ácido carboxílico	Ácido acético	Ácido carboxílico
	PROPENO	Alqueno	Acetil metil carbinol	Álcool terciário
	4-Etil-3-tiossemicarbazida	Tiossemicarbazona	Álcool isoamílico	Álcool
	Álcool isoamílico	Álcool	CIS-2-PENTENO	Alqueno

2-metil-1-butanol	Álcool	Hept-1-eno	Alqueno
Butane-2,3-diol	Diol	1-Decene	Alqueno
Feniletan-1-ol	Álcool	Butane-2,3-diol	Diol
Acetil metil carbinol	Álcool terciário	1,3-Butanediol	Diol
		Feniletan-1-ol	Álcool aromático

Alguns compostos orgânicos voláteis (COVs) têm demonstrado toxicidade contra fitopatógenos, mas informações sobre seu efeito in vivo e a contribuição específica de cada COV para o biocontrole ainda são escassas. Neste estudo, embora os compostos identificados não tenham sido isolados e seus efeitos diretos na redução do crescimento micelial e da severidade da antracnose em frutos de mamão não tenham sido identificados, foram observados resultados relevantes.

Um trabalho anterior realizado por Martins et al. (2019) avaliou o efeito in vitro e in vivo de dois COVs, ácido 3-metilbutanóico e ácido 2-metilbutanóico, produzidos por *Bacillus amylolicefaciens* no controle da antracnose causada por *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro. Esse estudo verificou a inibição do crescimento micelial e o controle da antracnose, embora esses compostos específicos não tenham sido observados no nosso estudo.

Os COVs têm a capacidade de fornecer uma rápida e precisa identificação de organismos vizinhos, permitindo a ativação de propriedades específicas relacionadas ao biocontrole. Pesquisas recentes relataram o amplo espectro de atividades biológicas dos COVs, incluindo atividades antifúngicas, antibacterianas e a função eliciadora que promove a imunidade da planta, como os ácidos jasmônico e salicílico.

Em nosso estudo, foi observado que a bactéria *Pseudomonas gineculata* produziu o dissulfeto dimetil, que apresentou efeitos bacteriostáticos contra dois patógenos bacterianos, *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium vitis*. Essa bactéria também produziu compostos difusíveis e quitinase, evidenciando seu potencial biocontrolador.

É importante ressaltar que muitas espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus* têm sido utilizadas como agentes de biocontrole contra fitopatógenos, relatando-se a produção de COVs com atividade antibacteriana. Por exemplo, *Pseudomonas fluorescens* WR-1 produziu COVs como benzotiazol e 1-metil naftaleno com efeitos bacteriostáticos contra o patógeno do tomate *Ralstonia solanacearum*. *Bacillus* cepa D13 produziu álcool decílico e 3,5,5-trimetilhexanol contra *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, enquanto *Bacillus subtilis* produziu benzaldeído, nonanal, benzotiazol e acetofenona contra *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

A 2-undecanona, produzida por *Pseudomonas geniculata* neste estudo, já foi relatada em consórcio com outros COVs, como heptadecano e 2-tridecanona, produzidos por *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9, no controle de *Ralstonia solanacearum*.

Além disso, o acetato de etila produzido por todas as bactérias na ausência do fungo e por *Cryseobacterium* spp na presença do fungo demonstrou redução significativa no crescimento micelial do patógeno, destacando seu potencial biocontrolador. Outra substância importante para a formação de biofilme foi o álcool fenílico, produzido por *Cryseobacterium* spp. tanto na ausência quanto na presença do fungo, o que sugere sua participação na agregação bacteriana.

A formação de biofilme é um processo complexo, onde os COVs podem atuar como sinalizadores químicos, permitindo a comunicação entre as bactérias e a formação de estruturas de proteção contra estresses ambientais e competição. O *Bacillus subtilis*, em particular, é um importante modelo de estudo para a formação de biofilme, sendo uma comunidade cooperativa com diferenciação populacional de progenitores isogênicos especializados e produção de macromoléculas que formam a matriz do biofilme.

Entretanto, mais pesquisas e estudos sobre a interação planta-patógeno-antagonista são necessários para compreender quais compostos estão diretamente relacionados ao biocontrole, formação de biofilme e como os COVs podem ser utilizados de forma combinada para benefício agrícola.

REFERÊNCIAS

- AGISHA, Valiya Nadakkakath et al. Broad-spectrum antimicrobial activity of volatile organic compounds from endophytic *Pseudomonas putida* BP25 against diverse plant pathogens. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n. 11, p. 1069-1089, 2019.
- ASARI, Shashidar et al. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 6, p. fiw070, 2016.
- BIANCIOTTO, Valeria et al. Mucoid mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and non-mycorrhizal carrot roots. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 14, n. 2, p. 255-260, 2001.
- BRANDA, Steven S. et al. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. **Molecular microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1229-1238, 2006.
- BRANDA, Steven S. et al. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 20, p. 11621-11626, 2001.
- CALVO, H. et al. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. **Food microbiology**, v. 63, p. 101-110, 2017.
- CAPPELLARI, Lorena del Rosario; BANCHIO, Erika. Microbial volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* GB03 ameliorate the effects of salt stress in *Mentha piperita*, primarily through acetoin emission. **Journal of plant growth regulation**, v. 39, p. 764-775, 2020.
- CHENNIAPPAN, C. et al. Biocontrol efficiency of native plant growth-promoting rhizobacteria against rhizome rot disease of turmeric. **Biological Control**, v. 129, p. 55-64, 2019.
- CHI, Mengshan et al. Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance, and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. **Biological Control**, v. 90, p. 113-119, 2015.
- D'ALESSANDRO, MARCO et al. Volatiles produced by soil-borne endophytic bacteria increase plant pathogen resistance and affect tritrophic interactions. **Plant, cell & environment**, v. 37, n. 4, p. 813-826, 2014.
- DAMASCENO, Caroline Lopes et al. Postharvest biocontrol of anthracnose in bananas by endophytic and soil rhizosphere bacteria associated with sisal (*Agave sisalana*) in Brazil. **Biological Control**, v. 137, p. 104016, 2019.

DANDURISHVILI, N. et al. Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium crown* gall tumours on tomato plants. **Journal of applied microbiology**, v. 110, n. 1, p. 341-352, 2011.

DIGGLE, Stephen P.; WHITELEY, Marvin. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. **Microbiology**, v. 166, n. 1, p. 30, 2020.

DUKARE, Ajinath Shridhar et al. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 9, p. 1498-1513, 2019.

FERNANDO, WG Dilantha et al. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 955-964, 2005.

FIALHO, Mauricio Batista et al. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 925-932, 2010.

GIORGIO, Annalisa et al. Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1056, 2015.

GOUDJAL, Yacine et al. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 59-65, 2014.

GOTOR-VILA, Amparo et al. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. **Food Microbiology**, v. 64, p. 219-225, 2017.

KADDES, Amine et al. Endophytic fungal volatile compounds as a solution for sustainable agriculture. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1065, 2019.

KANCHISWAMY, Chidananda Nagamangala; MALNOY, Mickael; MAFFEI, Massimo E. Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 4, p. 206-211, 2015.

KAUFRMAN, G. et al. Flat drops, elastic sheets, and microcapsules by interfacial assembly of a bacterial biofilm protein, BslA. **Langmuir**, v. 33, n. 47, p. 13590-13597, 2017.

KOBAYASHI, Kazuo; IWANO, Megumi. BslA (YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms. **Molecular microbiology**, v. 85, n. 1, p. 51-66, 2012.

LAMARI, L. Assess 2.0: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification; **American Phytopathological Society**: St. Paul, MN, USA, 2002.

- LIMA, G. et al. Antifungal activity of ketones: **a review. *Molecules***, v. 23, n. 4, p. 910, 2018.
- MASSAWE, Venance Colman et al. Volatile compounds from endophytic *Bacillus* spp. have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. ***Phytopathology***, v. 108, n. 12, p. 1373-1385, 2018.
- MARTINS, Samuel Julio et al. Microbial volatile organic compounds control anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). ***Biological control***, v. 131, p. 36-42, 2019.
- OSSOWICKI, Adam; JAFRA, Sylwia; GARBEVA, Paolina. The volatile antimicrobial power of rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. ***PloS one***, v. 12, n. 3, p. e0174362, 2017.
- OSTROWSKI, Adam et al. YuaB synergistically functions with exopolysaccharide and TasA amyloid fibers to enable biofilm formation in *Bacillus subtilis*. ***Journal of bacteriology***, v. 193, n. 18, p. 4821-4831, 2011.
- RAJER, Faheem Uddin et al. Growth promotion of rice seedlings by *Bacillus* species and suppression of bacterial leaf streak under greenhouse conditions. ***Pathogens***, v. 11, n. 11, p. 1251, 2022.
- RAJER, Faheem Uddin et al. Volatile organic compounds produced by soil isolate *Bacillus subtilis* FA26 induce adverse ultrastructural changes in *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* cells, the causal agent of bacterial ring rot of potato. ***Microbiology***, v. 163, n. 4, p. 523-530, 2017.
- RAZA, Waseem et al. Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 restrict the growth and virulence traits of *Ralstonia solanacearum*. ***Microbiological research***, v. 192, p. 103-113, 2016a.
- RAZA, Waseem et al. Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to volatile organic compounds produced by a biocontrol strain, *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. ***Scientific Reports***, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016b.
- RAZA, Waseem et al. Effects of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth and virulence traits of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, v. 100, p. 7639-7650, 2016c.
- ROMERO, Diego et al. Uma proteína acessória necessária para ancoragem e montagem de fibras amiloides em biofilmes de *B. subtilis*. ***Molecular microbiology***, v. 80, n. 5, p. 1155-1168, 2011.
- RUDRAPPA, Thimmaraju et al. The elicitor acetoin from rhizobacteria induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. ***Communicative & Integrative Biology***, v. 3, n. 2, p. 130-138, 2010.
- RYU, Choong-Min et al. Bacterial volatile compounds induce systemic resistance in *Arabidopsis*. ***Plant physiology***, v. 134, n. 3, p. 1017-1026, 2004.

SAFDARPOUR, Fahime; KHODAKARAMIAN, Gholam. Evaluation of antagonistic and growth-promoting activities of tomato endophytic bacteria challenged with *Verticillium dahliae* under in vitro and in vivo conditions. **Biological Journal of Microorganism**, v. 7, n. 28, p. 77-90, 2018.

SINGH, R. et al. The role of volatile organic compounds (VOCs) in plant defense against pathogens and herbivores: a systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 6, p. 1458, 2019. VLAMAKIS, Hera et al. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. **Genes & Development**, v. 22, n. 7, p. 945-953, 2008.

WANG, Zhirong et al. Potential of volatile organic compounds emitted by *Pseudomonas fluorescens* ZX as biological fumigants for controlling citrus green mold in postharvest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 7, p. 2087-2098, 2021.

XIE, Shanshan et al. Antibacterial effects of volatile compounds produced by *Bacillus strains* against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular plant pathology**, v. 19, n. 1, p. 49-58, 2018.

ZHENG, Li et al. Identification of volatile organic compounds for the biocontrol of postharvest fruit spot disease in lychee. **Postharvest Biology and Technology**, v. 155, p. 37-46, 2019.

ZHENG, Min et al. Antimicrobial effects of volatile compounds produced by two antagonistic strains of *Bacillus* against mango postharvest anthracnose pathogen. **Biological Control**, v. 65, n. 2, p. 200-206, 2013.